

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**GISELE ARRUDA**

**AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA CELULAR EM MELANÓCITOS E CÉLULAS DE  
MELANOMA PELA AÇÃO DO OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE**



Curitiba

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**GISELE ARRUDA**

**AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA CELULAR EM MELANÓCITOS E CÉLULAS DE  
MELANOMA PELA AÇÃO DO OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez

Co-orientadora: Profa. Dra. Sheila M. B. Winishofer

Co-orientadora: Profa. Dra. Guilhermina Rodrigues Nolero

Curitiba

2011

*A minha maravilhosa família, em especial  
aos meus pais, Marcos e Carla pelo apoio,  
amor e incentivo.*

*Aos meus irmãos Rafael e Ronaldo por  
torcerem e acreditarem em mim, por me  
apoiares sempre.*

*Ao meu sobrinho que tanto amo Marcos...  
Que me dá alegria e forças para nunca  
desistir e me mostra o quanto amamos e  
dependemos da família.*

*Ao meu namorado Rafael pelo amor, pelo  
carinho, compreensão, pela paciência e me  
apoiares sempre.*

*A Deus pela inteligência e pela  
oportunidade.*

## AGRADECIMENTOS

*À Deus por me dar forças, sabedoria, responsabilidade e pelas inúmeras oportunidades de crescimento e conquistas alcançadas me proporcionando tantos momentos especiais.*

*À Professora Dra. Glaucia Regina Martinez, orientadora e amiga, sou grata por acreditar em mim e pelo carinho que depositou neste trabalho. Algumas vezes, mesmo imersa à emoção, conseguiu derramar luz para me conduzir ao melhor caminho, guiando meus passos ainda que pequenos para o mundo da pesquisa e me fazendo encontrar o “ponto certo”. Vou sentir saudade das orientações, das idéias maravilhosas e inteligentes para o trabalho. Muito obrigada pela inteligência!*

*Às Professoras Dra. Sheila Winnishofer e Guilhermina Noletto, co-orientadoras, obrigada pelas idéias de melhoria do trabalho, pelas correções, pelo carinho, incentivo, ajuda nos experimentos e apoio em todos os momentos. Obrigada por tudo!*

*Ao meu maior tesouro, meus amados e maravilhosos pais, Marcos e Carla, obrigada por tudo; por sempre me incentivarem aos estudos, pelo apoio e inteligência com que me conduziram para a vida; pelas idéias, sempre vindas nas horas certas; pelo carinho, compreensão, amizade, afeto, paciência, por me fazerem acreditar que sou capaz; a vocês só tenho a dizer meu muito obrigado pelos intermináveis momentos que me proporcionaram alegria e amor. Amo vocês! A minha família inteira.*

*Aos meus tios e pais, Olga e Osni, que me acolheram como filha, que sempre torceram para mim, me dando muita força para nunca desistir dos meus sonhos. Minha segunda morada, e uma das melhores escolas que tive, a casa deles! Obrigada pelo apoio, pela morada, e principalmente pelo amor e carinho. Não esquecendo dos meus primos, Fabiano e Roberto (in memoriam), que sempre me ajudaram. Amo todos vocês, nunca vou esquecer o que fizeram por mim, obrigada por tudo!*

*A minha amiga e mãe (E que mãe!), Regina, sempre me apoiou, me ajudou, me incentivou, me deu forças, torcendo para que tudo desse certo. Regina você é uma pessoa maravilhosa e abençoada. Deus, às vezes, coloca anjos em nossas vidas, que nunca serão esquecidos, pela sua bondade, dignidade, paciência e principalmente amor ao próximo. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa, que fará toda a diferença em minha vida.*

*Aos meus irmãos, Rafael e Ronaldo, me deram forças para que tudo desse certo, sempre torcendo por mim! Valeu pelo apoio, amo muito vocês!*

*Ao meu sobrinho, Marcos, que me dá alegria, esperança para que eu continue sempre. Amo você!*

*Ao meu namorado, Rafael, obrigada pelo carinho, respeito, amor, incentivo e principalmente pela compreensão. Soube me esperar e esteve sempre presente em todos os momentos, me dando força. Te amo, obrigada!*

*As minhas avós, Ivone e Mercedes por sempre estarem rezando para que tudo desse certo.*

*A tia Bete pelas idéias, pelo apoio, por sempre me incentivar para o caminho da pesquisa, me guiando com a sua própria experiência e inteligência.*

*As demais Professoras do Laboratório de Oxidações Biológicas, Professoras Eva, Maria Eliane e Silvia, pelo apoio, sempre presentes. Muito obrigada!*

*Em especial aos companheiros de laboratório, Alex, Ana, Beth, Carol Lane, Ca, Déia, Glaucio, Jú, Pati, pelas ajudas em meus experimentos, pelo apoio e companheirismo.*

*Amanda, obrigada pelo apoio, incentivo, idéias e a amizade maravilhosa, seus conselhos levarei para toda a vida. Carol, uma pessoa com uma dignidade admirável, apendi muito com você nessa jornada, obrigada pelas caronas, pelo apoio e incentivo, pelas idéias, pelo carinho e pela sua amizade. Eduardo, sempre me ajudou em todas as técnicas que eu tive dificuldade e me incentivou nos experimentos. Fernanda, uma pessoa de personalidade forte, sempre me ajudou com inteligência, obrigada pela ajuda nos experimentos, pelas idéias, pelo apoio, pelo incentivo. Hudson, obrigado pela ajuda nas citometrias, sempre me apoiou e meu deu forças. Paulo, obrigada por me passar o protocolo de fotossensibilização e me ajudar sempre. Thiago, obrigado pela ajuda nos RT-PCR, na análise dos dados e pela força. Obrigada por tudo, valeu pessoal!*

*Aos amigos da minha cidade, Ale, Ana (afilhada), Carol (prima), Cati, Cris, Dani (afilhada), Ecilda, Eliane (madrinha), Elô e Fer (cunhadas), Fran, Iva (mãe 2), Mari (mãe 3) e Valmir que de alguma forma me apoiaram, me entenderam e me incentivaram.*

*Ao Jeff e Andy, que aguentaram as idas e vindas na casa da Regina, me apoiando dessa forma.*

*Aos meus colegas da turma do mestrado, que de alguma maneira me ajudaram.*

*A todos os Professores da Universidade Federal do Paraná, pela inteligência com que transmitiam conhecimento em suas aulas, pela ajuda e pelas idéias. Obrigada!*

*A Universidade Federal do Paraná, ao Setor de Ciências Biológicas, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao programa de Pós-graduação em ciências bioquímica, pelo espaço, pela disponibilização de equipamentos e técnicas.*

*Aos alunos e professores dos departamentos de Fisiologia e Patologia, pela disponibilidade de ajudar no manuseio de equipamentos e realização de algumas técnicas.*

*Às agências financiadoras do projeto: Fundação Araucária, FAPESP, CAPES, INCT de Processos Redox em Biomedicina - Redoxoma e CNPq, esta última em especial, pela bolsa.*

*Àqueles, aos quais eu possa ter esquecido de mencionar individualmente, ou pelo nome, que perdoem a falha e recebam meu carinho e meu muito obrigada.*

*A todos o meu muito obrigado!!!*

*“Se não puder se destacar pelo talento, vença pelo esforço.” (Dave Weinbaum).*

*“ Nós somos aquilo que fazemos repetidamente. Excelência, então, não é um modo de agir, mas um hábito.” (Aristóteles)*

*“Como um escudo te cercará a sua verdade, não temerás sustos noturnos, nem a seta que voa de dia, nem o inimigo que anda nas trevas, porque mandou aos seus anjos acerca de ti que te guardem em todos os seus caminhos.” (Salmo 91)*

## RESUMO

Senescência celular é um processo natural caracterizado principalmente pela parada do crescimento, enquanto que as células cancerosas proliferam indefinidamente. Entretanto, descobertas recentes mostraram que células de melanoma podem ainda sofrer senescência induzida por oncogenes ou pelo estresse. Considerando-se que a senescência pode também ser explorada como uma estratégia terapêutica em pacientes com melanoma, o nosso principal objetivo foi investigar o papel do oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ) gerado pela fotossensibilização com Rosa Bengala (RB) e luz visível na senescência de células de melanoma murino (B16-F10) e melanócitos murinos (Melan-a). Como as células de Melan-a crescem na presença do estimulador da proliferação celular PMA (forbol 12-miristato 13-acetato), ensaios com B16-F10 foram realizadas na presença e na ausência deste composto em meio de cultura como controle. Observou-se diminuição na viabilidade de células B16-F10 avaliada pelo ensaio de azul de tripan após 24 e 48 h na presença de PMA sem irradiação (8,4%) e após 96 h em células sem PMA, mas irradiadas na presença de RB (6,1%). Observou-se aumento da atividade da senescência celular (ensaio  $\beta$ -galactosidase) em células B16-F10 sem PMA, após 48h da irradiação na presença de RB (300%) e em células B16-F10 com PMA, após 48h da irradiação na presença e ausência de RB (presença: 500%; ausência: 150%), mas esse efeito é menos intenso a partir de 96h. Não foram observadas diferenças na análise de ciclo celular por Citometria de Fluxo e nenhuma alteração foi observada em células Melan-a em todos os ensaios. Embora nossos resultados mostrem a indução da atividade  $\beta$ -galactosidase em células de melanoma em certas condições, a análise do ciclo celular não indica parada do crescimento, por isso sugerimos que este tratamento está afetando a sinalização, mas ainda outros dados moleculares são necessários para confirmar esse processo de senescência celular.

Palavras-chaves: Melanoma, Oxigênio Singlete, Senescência Celular



## ABSTRACT

Cellular senescence is a natural process mainly characterized by growth arrest, while cancer cells proliferate indefinitely. However, recent findings showed that melanoma cells can still undergo oncogene or stress-induced senescence. Considering that senescence may also be exploited as a therapeutic strategy in melanoma, our main goal was to investigate the role of singlet molecular oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) generated by photosensitization with Rose Bengal (RB) and visible light on cellular senescence of murine melanoma cells (B16-F10) and murine melanocytes (Melan-a). Since, Melan-a cells grow in the presence of the stimulator of cell proliferation PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), assays with B16-F10 were performed in the presence and absence of this compound in culture media as control. We observed decreased viability of B16-F10 cells evaluated by trypan blue assay after 24 and 48h with PMA without irradiation (8,4%) and after 96h in cells without PMA, but irradiated in the presence of RB (6,1%). We observed increased activity of cellular senescence ( $\beta$ -galactosidase assay) in B16-F10 cells without PMA after 48h of irradiation in the presence of RB (300%) and in B16-F10 cells with PMA after 48h of irradiation in the presence and absence of RB (presence: 500%; absence: 150%), but this effect is less intense after 96h. No differences were observed in cell cycle analysis by Flow Citometry and any alteration was observed in Melan-a cells in all assays. Even though our results show induction of  $\beta$ -galactosidase activity in melanoma cells under some conditions, cell cycle analysis does not indicate growth arrest, so we suggest that this treatment is affecting transduction signaling, but further molecular data are needed to confirm this cellular senescence process.

Keywords: melanoma, singlet oxygen, senescence

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: PROGRESSÃO E PONTOS DE CONTROLE DO CICLO CELULAR.....	21
FIGURA 2: PAPEL DA PROTEÍNA RB NO MECANISMO DE CONTROLE DO AVANÇO DO CICLO CELULAR.....	22
FIGURA 3 – ENVOLVIMENTO DOS SUPRESSORES TUMORAIS NO DECORRER DAS FASES DO CICLO CELULAR.....	23
FIGURA 4: PROGRESSÃO NORMAL DO CICLO CELULAR.....	25
FIGURA 5: PARADA DO CICLO CELULAR PARA REPARO DE DANOS AO DNA.....	26
FIGURA 6: SISTEMA PARA FOTOSENSIBILIZAÇÃO.....	46
FIGURA 7: MICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DAS CÉLULAS B16-F10 COM PMA APÓS 96 H DO TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ .....	48
FIGURA 8: VIABILIDADE DAS CÉLULAS MELAN-A 24, 48, 72 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ .....	52
FIGURA 9: VIABILIDADE DAS CÉLULAS B16-F10 COM E SEM PMA APÓS 24, 48, 72 E 96 H DO TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ .....	53
FIGURA 10: MORFOLOGIA DAS CÉLULAS MELAN-A APÓS 48 H DO TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ .....	57
FIGURA 11: MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16-F10 SEM PMA APÓS 48 H DO TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ .....	59
FIGURA 12: MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16-F10 COM PMA APÓS 48 H DO TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ .....	60
FIGURA 13: FOTOGRAFIA DO PELLET DAS CÉLULAS B16-F10 COM PMA APÓS 96 H DO TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ .....	61
FIGURA 14: MICROGRAFIA DAS CÉLULAS B16-F10 COM PMA APÓS 96 H DO TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ .....	62
FIGURA 15: SENESCÊNCIA DAS CÉLULAS MELAN-A COM E SEM PMA 48 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ .....	64
FIGURA 16: SENESCÊNCIA DAS CÉLULAS B16-F10 COM E SEM PMA 48 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ .....	65

FIGURA 17: DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS MELAN-A ATRAVÉS DAS FASES DO CICLO CELULAR (REPRESENTAÇÃO POR HISTOGRAMA).....	69
FIGURA 18: CICLO CELULAR DAS CÉLULAS MELAN-A 48 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ .....	70
FIGURA 19: DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS B16-F10 SEM PMA ATRAVÉS DAS FASES DO CICLO CELULAR (REPRESENTAÇÃO POR HISTOGRAMA).....	71
FIGURA 20: DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS B16-F10 COM PMA ATRAVÉS DAS FASES DO CICLO CELULAR (REPRESENTAÇÃO POR HISTOGRAMA).....	72
FIGURA 21: CICLO CELULAR DAS CÉLULAS B16-F10 COM E SEM PMA 48 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

8-oxoguanina – 8-oxo-7,8-dihidroguanina

$\beta$ -Gal – Enzima  $\beta$  Galactosidase Ácida

ATP – Trifosfato de Adenosina

CAK – Quinase Ativadora de CdK

CdK – Quinase dependente de Ciclinas

CdK4 – Quinase dependente de Ciclina 4

CdK6 – Quinase dependente de Ciclinas 6

CdK4/6 – Quinase dependente de Ciclina 4 e 6

CDKIs – Inibidores das Quinases dependente de Ciclinas

CDKN2A – Locus que codifica as Proteínas p16 e p19

DAG – Diacilglicerol

DHPNO<sub>2</sub> – Endoperóxido *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1-4-naftilideno)dipropanamida

DMF – *N,N*-dimetilformamida

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

DP – Proteína acoplada ao Fator de Transcrição 2

E2F1 – Fator de Transcrição 2

Fase M – Fase Mitótica do Ciclo Celular

G<sub>1</sub>-CdK – Quinase dependente de Ciclina da fase G<sub>1</sub> do ciclo celular

G<sub>1</sub>/S-CdK – Quinase dependente de Ciclina da fase G<sub>1</sub>/S do ciclo celular

Gy – Gray (dose de Raio-X)

INCA – Instituto Nacional do Câncer

INK4a – Locus que codifica a Proteína p19/p14

ITP – Inositol-1,4,5-trifosfato

LEDs – Lâmpadas Diodo Emissor de Luz

M-CdK – Quinase dependente de Ciclina da fase M do ciclo celular

MDM2 – Ubiquitina Ligase

p14<sup>ARF</sup> – Proteína 14

p15<sup>INK4b</sup> – Proteína 15

p16<sup>INK4a</sup> – Proteína 16

p18 – Proteína 18

p19<sup>ARF</sup> – Proteína 19

p21<sup>Cip1</sup> – Proteína 21

p27<sup>Kip1</sup> – Proteína 27

p53 – Proteína 53

p57<sup>Kip2</sup> – Proteína 57

PBS – Solução Salina Tamponada

PDT – Terapia Fotodinâmica

pH – Potencial Hidrogeniônico

PIP2 – Proteína Fosfatidil Inositol Bifosfato

PKC – Proteína Quinase C

PMA – Éster de Forbol 12-Meristato 13-Acetato

Ponto R – Ponto de Restrição do Ciclo Celular

PP2A – Proteína Fosfatase 2A

pRb – Proteína Retinoblastoma

RB – Rosa Bengala

RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

RPMI – *Rosewell Park Memorial Institute*

RTq-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativo

S-CdK – Quinase dependente de Ciclina da fase S do ciclo celular

SFB – Soro Fetal Bovino

SH80 – Ácido Propiônico (2-{4-[(7-Bromo-2-quinolinyloxy]phenoxy})

UV – Radiação Ultravioleta

UV-A – Radiação Ultravioleta A

UV-B – Radiação Ultravioleta B

XK469 – Ácido Propiônico (2-{4-[(7-Chloro-2-quinolinyloxy]phenoxy})

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
2.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	18
2.1.1 OXIGÊNIO SINGLETE.....	19
2.2 CICLO CELULAR.....	20
2.3 SENESCÊNCIA CELULAR.....	27
2.4 MELANÓCITOS E MELANOMA.....	32
2.5 TERAPIA FOTODINÂMICA.....	36
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>41</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
<b>5 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>43</b>
<b>6 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
6.1 ESTERILIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	44
6.2 LINHAGENS CELULARES.....	44
6.2.1 Condições de Cultivo das Células B16-F10 e Melan-a.....	44
6.3 GERAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE – FOTOSSENSIBILIZAÇÃO.....	45
6.4 VIABILIDADE CELULAR POR AZUL DE TRYPAN.....	46
6.5 MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	47
6.6 SENESCÊNCIA CELULAR POR $\beta$ -GALACTOSIDASE.....	47
6.7 ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....	48
6.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
7.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	50
7.1.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS MELAN-A 24, 48, 72 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM OXIGÊNIO SINGLETE.....	50
7.1.2 VIABILIDADE DAS CÉLULAS B16-F10 24, 48, 72 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM OXIGÊNIO SINGLETE.....	52
7.2 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR.....	57



7.2.1 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS MELAN-A 48 H APÓS O TRATAMENTO.....	57
7.2.2 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16-F10 SEM PMA 48 H APÓS O TRATAMENTO.....	58
7.2.3 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16-F10 COM PMA 48 HORAS APÓS O TRATAMENTO.....	59
7.3 AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA CELULAR.....	62
7.3.1 AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA DAS CÉLULAS MELAN-A COM E SEM PMA 48 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM OXIGÊNIO SINGLETE.....	62
7.3.2 AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA DAS CÉLULAS B16-F10 COM E SEM PMA 48 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM OXIGÊNIO SINGLETE.....	64
7.4 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR.....	68
7.4.1 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS MELAN-A 48 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM OXIGÊNIO SINGLETE.....	68
7.4.2 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS B16-F10 COM E SEM PMA 48 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM OXIGÊNIO SINGLETE.....	70
<b>8 DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>9 CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Célula senescente é aquela que tem como principal característica uma parada de proliferação (CAMPISI; FAGAGNA, 2007). Células tumorigênicas, entretanto, não entram nesse estado de parada do crescimento e proliferam por tempo indeterminado (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961). Várias evidências sugerem que a resposta senescente evoluiu para suprimir a tumorigênese, atuando como mecanismo de segurança para prevenir a proliferação de células com risco de sofrer transformações neoplásicas (CAMPISI, 2000). Muitos estudos indicam que a senescência restringe a progressão do tumor e pode potencialmente servir como um marcador útil para o estadiamento do tumor (COLLADO; SERRANO, 2006). Dessa forma, é muito útil o entendimento dos mecanismos e das relações entre a senescência celular e o desenvolvimento tumoral.

O índice de incidência de câncer de pele tem aumentado no Brasil, principalmente em pessoas de pele mais clara das regiões sudeste e sul, incluindo o do tipo melanoma (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2010). O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos. O câncer de pele corresponde a 25% de todos os tumores malignos e o melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas do órgão, entretanto, o agravante desse tipo de câncer de pele é a sua alta possibilidade de sofrer metástase (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2010).

Para o tratamento de várias alterações na pele, tanto lesões cancerosas como não cancerosas, é utilizada a terapia fotodinâmica (PDT). Essa terapia consiste na utilização da luz e de um fotossensibilizador, o qual absorve a luz e, no estado excitado, pode transferir elétrons para biomoléculas ou energia para o oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS), tal como o oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ). Essas espécies reativas levarão as células à morte por apoptose ou necrose, destruindo assim as lesões ou tumores (OLEINICK; MORRIS; BELICHENKO, 2002).

A senescência dos organismos (envelhecimento) é considerada dependente, pelo menos em parte, dos progressivos danos oxidativos

causados por elevadas concentrações dessas espécies reativas de oxigênio, o que implica um papel importante de ROS no processo de envelhecimento (STRECKER *et al.*, 2010).

As espécies reativas de oxigênio podem ter um papel duplo nos sistemas biológicos, podendo trazer benefícios ou malefícios para o organismo (VALKO *et al.*, 2006). Dentre os malefícios, a espécie reativa conhecida como  $^1\text{O}_2$ , pode reagir com a molécula de ácido desoxiribonucleico (DNA), aminoácidos, colesterol e outros lipídios, promovendo alterações nas células e levando à perda de função celular ou morte. Como benefício, concentrações moderadas de ROS são importantes para defesa contra agentes infecciosos.

Dessa forma, este trabalho avaliará o efeito do  $^1\text{O}_2$  em melanócitos e células de melanoma com foco no processo de senescência celular, buscando uma melhor compreensão do papel do  $^1\text{O}_2$  no mecanismo da transformação maligna e também nos eventos relacionados a terapias como a PDT.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O oxigênio molecular ( $O_2$ ) obtido da atmosfera é vital para organismos aeróbios, porém, espécies reativas que são geradas intracelularmente a partir do  $O_2$  podem ameaçar a integridade celular por meio da oxidação de biomoléculas, numa situação conhecida por estresse oxidativo (AUGUSTO, 2006).

O ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio molecular singlete ( $^1\Delta_gO_2$ ; abreviado  $^1O_2$ ), ozônio ( $O_3$ ), ácido hipocloroso (HOCl) e radicais hidroxila ( $\bullet OH$ ), hidroperoxila ( $HOO^{\bullet}$ ) e alcóxila ( $LO^{\bullet}$ ) são exemplos de espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas pelo organismo; existem também as chamadas espécies reativas de nitrogênio (RNS) como o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (HALLIWELL, 2005; AUGUSTO, 2006).

As ROS e RNS podem ser geradas pela ação de raios-X, radiação gama e ultravioleta (UV) (DJORDJEVIC, 2004), pelo metabolismo de drogas e xenobióticos, na fagocitose em macrófagos e neutrófilos (WINTERBOURN, 2008) e por vários sistemas enzimáticos (DJORDJEVIC, 2004). Outra fonte de ROS e RNS é a mitocôndria, que, apesar de ser a responsável pela produção de energia (ATP) para o organismo, também gera espécies reativas no processo de fosforilação oxidativa (WINTERBOURN, 2008).

Como as ROS e RNS são produtos do metabolismo normal do organismo, elas podem trazer ou não ações deletérias. Os efeitos benéficos das ROS estão associados a concentrações moderadas desses compostos no organismo, como na defesa contra agentes infecciosos e indução de resposta mitogênica (VALKO *et al.*, 2007). Certos níveis de espécies reativas são necessários para diferentes funções fisiológicas normais, como o enovelamento de proteínas nascentes no retículo endoplasmático, que ocorre em um meio mais oxidante que o restante da célula para que ocorra a formação de pontes dissulfeto (AUGUSTO, 2006).

Já os efeitos danosos ocorrem quando há uma superprodução de ROS e/ou RNS ou quando há uma deficiência dos antioxidantes enzimáticos ou não-

enzimáticos (VALKO *et al.*, 2007).

Mais especificamente, o dano oxidativo pode gerar modificações nas cadeias de proteínas e do ácido desoxiribonucleico (DNA) pela adição de açúcares ou de produtos da peroxidação lipídica, resultado esse da reação das ROS com ácidos graxos insaturados (BENZIE, 1996; HALLIWELL, 2005). Além disso, a peroxidação lipídica na membrana celular compromete a sua funcionalidade, danificando a célula (BENZIE, 1996; HALLIWELL, 2005; VALKO *et al.*, 2006).

Outras alterações como oxidação da ribose e bases nitrogenadas do DNA; ligações cruzadas entre bases nitrogenadas e proteínas (COCHRANE, 1991) podem gerar mutações, alterações da expressão gênica, instabilidade e aberrações cromossômicas.

Assim, essas espécies reativas podem estar relacionadas com o desenvolvimento de diversos processos fisiopatológicos, como o envelhecimento (DROGE, 2003; CRUZAT *et al.*, 2007), o câncer (COOKE *et al.*, 2003; VALKO *et al.*, 2006; CRUZAT *et al.*, 2007), doenças inflamatórias, aterosclerose (CRUZAT *et al.*, 2007), doenças neurológicas (doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, síndrome de Down, doença de Alzheimer) (BONDY, 1995; COOKE *et al.*, 2003) doenças auto-imune e cardiovasculares (COOKE *et al.*, 2003).

Segundo Magalhães e Church (2006), ROS poderiam alterar o estado redox das células, funcionando como segundo mensageiro na regulação da expressão gênica, desenvolvimento, crescimento celular e apoptose. Os mesmos autores ainda citam que o dano oxidativo pode estar envolvido com o envelhecimento, onde ROS, como moléculas sinalizadoras, seriam cruciais em inúmeras funções celulares e estariam sob estrito controle.

### 2.1.1 OXIGÊNIO SINGLETE

O  $^1\text{O}_2$  é a espécie reativa que se configura em um estado excitado do  $\text{O}_2$ , pelo fornecimento de energia para superação da regra de restrição de spin, formando uma espécie muito mais reativa que o  $\text{O}_2$ . O  $^1\text{O}_2$  pode existir em dois estados excitados:  $^1\Delta_g$  com dois elétrons com spin opostos no mesmo orbital e

$^1\Sigma_g$  que possui um elétron em cada orbital degenerado. Este estado excitado tem baixa estabilidade, tendo um tempo de vida muito curto, sendo rapidamente convertido ao estado excitado  $^1\Delta_g$ .

O  $^1O_2$  é uma espécie altamente reativa com tempo de vida em água de aproximadamente 4 microsegundos (MACHADO, 2000). O  $^1O_2$  pode ser gerado fotoquimicamente, em particular com o corante Rosa Bengala para o estudo dos seus efeitos celulares (PERCIVAL; DODGE, 1983) e também por outros compostos fotossensíveis na terapia fotodinâmica. Quimicamente, o  $^1O_2$  pode ser formado por vários processos, como por exemplo, a reação do  $H_2O_2$  com hipoclorito de sódio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999) ou a decomposição térmica de endoperóxidos de derivados do naftaleno (MARTINEZ; MEDEIROS; DI MASCIO, 2000).

O  $^1O_2$  pode reagir com diferentes substratos biológicos, ocasionando oxidação (MACHADO, 2000; CADET *et al.*, 2003) e ciclo-adição, principalmente em sítios de elevada densidade eletrônica, tais como os presentes na guanina, cadeias laterais de aminoácidos contendo estruturas aromáticas e enxofre, ligações duplas de esteróides e lipídios insaturados (MACHADO, 2000). O dano no DNA gerado pelo  $^1O_2$  tem uma vital importância entre todas as possíveis lesões aos componentes celulares, devido ao fato do papel dessa biomolécula no armazenamento de informações e hereditariedade. O principal dano gerado pela ação do  $^1O_2$  é a formação de base oxidada, nesse caso, a 8-oxoguanina, que pode levar a mutações no DNA se não for reparada (AGNEZ-LIMA *et al.*, 2001; COOKE *et al.*, 2003; HALLIWELL, 2005; SONNTAG, 2006).

## 2.2 CICLO CELULAR

A função básica do ciclo celular é duplicar exatamente todo o conteúdo de DNA dos cromossomos e, com precisão, segregar as cópias dentro das duas células-filha geneticamente idênticas. Esse bom funcionamento é mantido por um sistema de controle do ciclo celular formado por proteínas regulatórias, as CdKs (quinases dependentes de ciclinas) (WARD, 2002; ALBERTS *et al.*, 2006).



O ciclo celular é composto de uma sequência ordenada e rigorosa de fases (FIGURA 1). A célula diferenciada se encontra em G0, onde ela atingiu sua diferenciação terminal e está quiescente. Se a célula está destinada a proliferar, ela entra no estágio G1 do ciclo, onde aumenta de tamanho e prepara as proteínas necessárias para a síntese de DNA. Nesta fase, a célula também é capaz de ser sensível às condições ambientais. Se estas não forem favoráveis, a divisão celular pára em G1. No entanto, se ultrapassar o ponto R (ponto de restrição), a divisão celular ocorrerá independente de condições ambientais favoráveis. Na fase S ocorre a síntese de DNA. No início da fase G2 existe outro ponto de controle importante, onde se verifica a integridade do DNA replicado. Finalmente, na fase M (mitótica), o DNA duplicado será equitativamente dividido entre as duas células filhas. A mitose pode ser impedida se na sua checagem forem constatadas anormalidades na divisão dos cromossomos (WARD, 2002). Esta sequência de fases, com seus respectivos pontos de controle, permitem que a célula complete seu ciclo normal, replicando-se sem dar origem a células anormais.

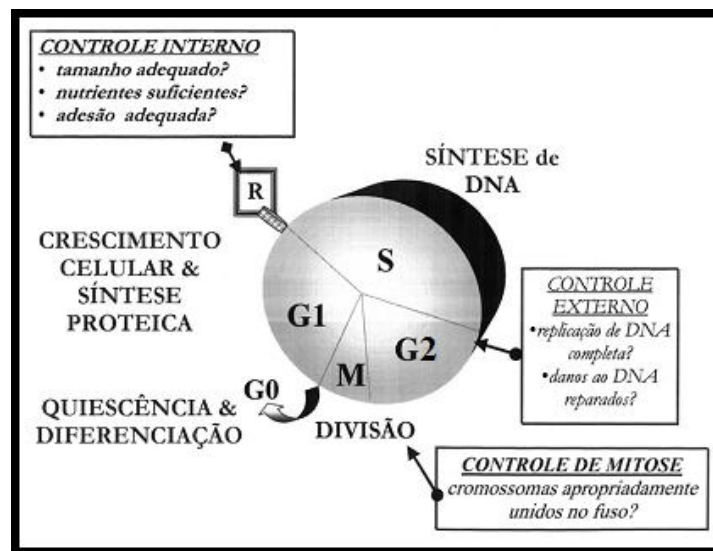


FIGURA 1 - PROGRESSÃO E PONTOS DE CONTROLE DO CICLO CELULAR

FONTE: WARD (2002)

As CdKs, que mantêm o controle do ciclo, são uma família de quinases que se tornam ativas apenas após a formação de complexos com ciclinas

específicas, que são proteínas regulatórias com concentração variável durante as fases do ciclo celular. Alguns dos complexos ciclinas-CdKs em vertebrados que auxiliam no ciclo celular são: G<sub>1</sub>-CdK (ciclina D associada a Cdk4 ou Cdk6), G<sub>1</sub>/S-CdK (ciclina E associada a Cdk2), S-CdK (ciclina A associada a Cdk2) e M-CdK (ciclina B associada a Cdk1). Cada complexo ciclina-CdK fosforila um grupo diferente de substratos protéicos. A formação do complexo ciclina-CdK não é suficiente para sua atividade, mas a atividade total é alcançada quando uma quinase ativadora de CdK (CAK) fosforila um aminoácido próximo à entrada do sítio ativo da CdK, causando uma mudança conformacional que leva ao aumento da atividade da CdK, permitindo que a quinase fosforile eficientemente a proteína-alvo e induza eventos específicos do ciclo celular (ALBERTS *et al.*, 2006). Os níveis das ciclinas oscilam durante as fases do ciclo para poder determinar o momento apropriado de sua ligação com as CdKs (PAULOVICH; TOCZYSKI; HARTWELL, 1997).

Segundo Ward (2002), algumas dessas CdKs se ligam diretamente à proteína retinoblastoma (pRb), fosforilando-a e inativando-a. A fosforilação de pRb provoca a liberação e ativação de E2F1, permitindo que E2F1 ative a transcrição dos genes-S para a fase S do ciclo celular como mostra a figura 2 (WARD, 2002).

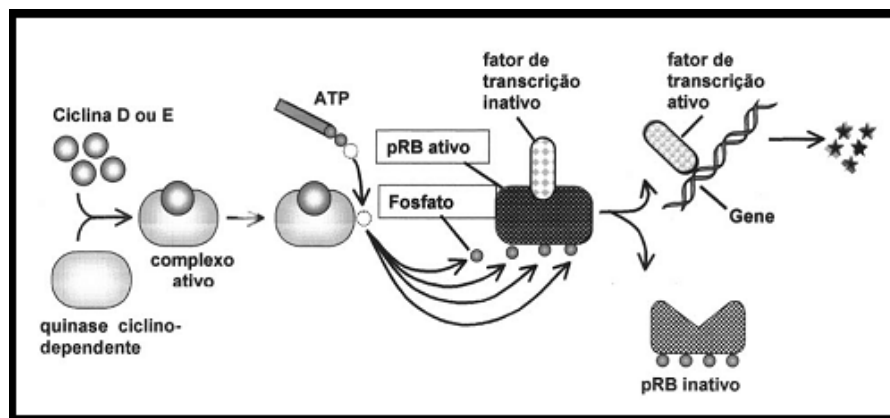


FIGURA 2 – PAPEL DA PROTEÍNA RB NO MECANISMO DE CONTROLE DO AVANÇO DO CICLO CELULAR

FONTE: WARD (2002)

A atividade ciclina-CdK é bloqueada por uma série de inibidores específicos (WARD, 2002) que atuam impedindo ou regulando negativamente

as vias sinalizadoras da progressão do ciclo de divisão celular (PAULOVICH; TOCZYSKI; HARTWELL, 1997). Os reguladores negativos ativam inibidores das CdKs: os CdKIs (inibidores das quinases dependentes de ciclinas). Eles podem ser agrupados em duas famílias de CdKIs, de acordo com seu mecanismo de ação, homologia e CdK alvo, como os do grupo da  $p21^{Cip1}/p27^{Kip1}/p57$ , que bloqueiam múltiplos complexos ciclina-CdKs e os da família  $p15/p16^{INK4a}/p18/p19^{ARF}$ , que inibem os complexos CdK4 e CdK6.

Na FIGURA 3 está representado o envolvimento dos supressores tumorais ( $p16$ ,  $p19$ ,  $p21$ ,  $p27$  e  $p53$ ) no decorrer das fases do ciclo celular.

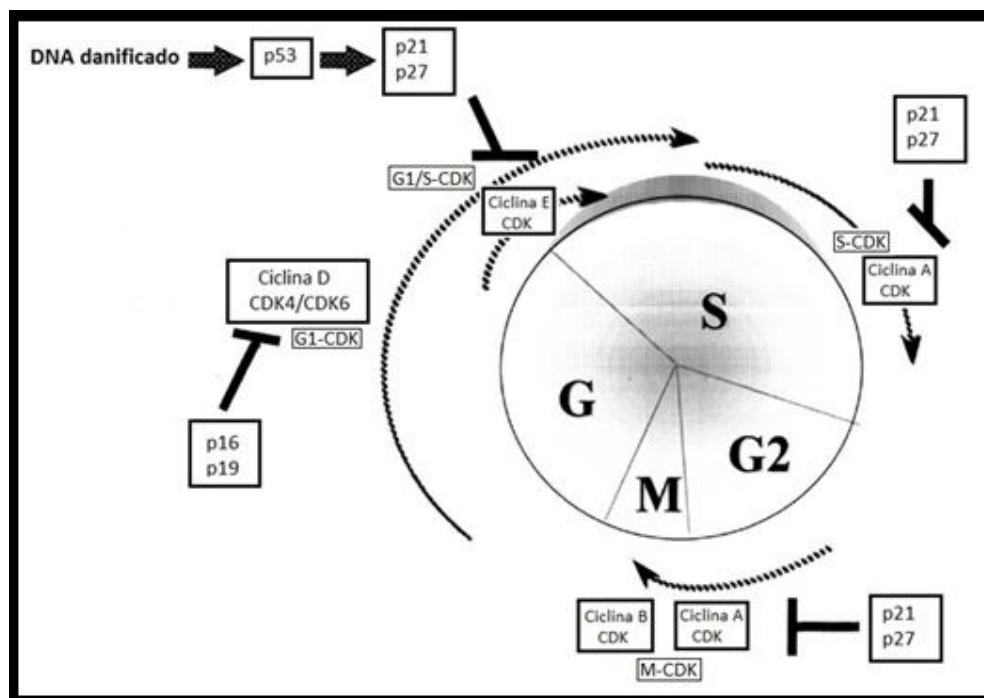


FIGURA 3 – ENVOLVIMENTO DOS SUPRESSORES TUMORAIS NO DECORRER DAS FASES DO CICLO CELULAR

A  $p27^{Kip1}$  é uma reguladora chave do ciclo celular em células de mamíferos. Essa proteína regula negativamente a progressão do ciclo celular inibindo diretamente o complexo ciclina E-CdK2 (GRAÑA; REDDY, 1995). O papel da  $p27^{Kip1}$  no controle do ciclo celular é muito complexo, uma vez que pode intervir também na atividade do complexo  $G_1$ -CdK (BORRIELLO *et al.*, 2007). A fosforilação de  $p27^{Kip1}$  inativa a sua função como um inibidor e inicialmente, facilita a ativação do complexo  $G_1$ -CdK (RAY *et al.*, 2009). Como

a perda de controle do ciclo celular é uma das alterações mais frequentes durante o desenvolvimento do tumor, a inibição dessas alterações é considerada como uma estratégia eficaz para eliminar as células cancerosas (LIU; YAMAUCHI, 2009).

A regulação da transcrição de  $p27^{Kip1}$  é mediada em parte por uma proteína chamada Foxo3a, que pertence a uma grande família de fatores de transcrição que controlam a expressão dos genes envolvidos na progressão do ciclo celular, adaptação ao estresse oxidativo e metabolismo (FU; TINDALL, 2008).

Os inibidores  $p21^{Cip1}$ ,  $p27^{Kip1}$  e  $p57^{Kip2}$  possuem atividades muito amplas, essas proteínas são capazes de inibir todos os complexos de ciclina-CdKs, por possuírem estruturas que os permitem ligar-se tanto à subunidade ciclina, quanto à CdK. A atividade destes inibidores está envolvida com sua capacidade de sequestrar as CdKs, mas o aumento da expressão destas pode exaurir os níveis dos inibidores, e a célula sai da fase G0, quiescente (SHERR; ROBERTS, 1999).

A  $p16^{INK4a}$  foi identificada pela sua capacidade de inibir a atividade da quinase CdK4/6 (SERRANO; HANNON; BEACH, 1993) e ser capaz de bloquear a passagem de G1 para a fase S em células que têm pRb funcional (KOH *et al.*, 1995). Portanto,  $p16^{INK4a}$  poderia inibir a atividade das CdK4 e CdK6, prevenindo a fosforilação de pRb, que, por sua vez, diminui a expressão de E2F1 (DYSON, 2010), controlando assim a progressão das fases G1/S do ciclo celular. Assim,  $p16^{INK4a}$  é um inibidor de CdKs e age por imposição de parada do ciclo celular especificamente em G1 (KIM; SHARPLESS, 2006; DIMRI, 2005; SHERR, 1996).

A p53 também é muito importante no controle do ciclo celular. Mutações associadas ao gene da p53 estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias, sendo considerado como um gene supressor tumoral em condições normais de uma célula (HOLLSTEIN *et al.*, 1991; GREENBLATT *et al.*, 1994). Segundo Collado, Blasco e Serrano (2007), o principal papel da p53 é eliminar células danificadas por provocar a sua auto-destruição, induzindo a apoptose, ou puxando-as para fora do estado proliferativo, induzindo assim a senescência celular.

A p53 e a pRb, são os exemplos mais conhecidos de genes supressores tumorais, exercendo um estreito controle da divisão celular. A p53, cujos níveis se mantêm baixos, mostra uma vigilância passiva sobre o ciclo celular, o qual prossegue normalmente (FIGURA 4). Quando ocorre um dano ao material genético, imediatamente os níveis de p53 se elevam, induzindo expressão de p21<sup>Cip1</sup> e de uma série de outros produtos gênicos que impedirão a ligação ciclina-CdK. Consequentemente, pRb não será fosforilada, impedindo assim a liberação do fator de transcrição formado pelo complexo E2F1-DP que não poderá ativar os genes essenciais para a progressão na fase S. Com isso, a célula pára no ciclo de divisão celular permitindo o reparo adequado do material danificado, como mostrado na FIGURA 5 (WARD, 2002).

A p19<sup>ARF</sup> regula a estabilidade da proteína p53 através da inativação do fator MDM2, uma ubiquitina-ligase que marca p53 para degradação proteossomal (KIM; SHARPLESS, 2006).

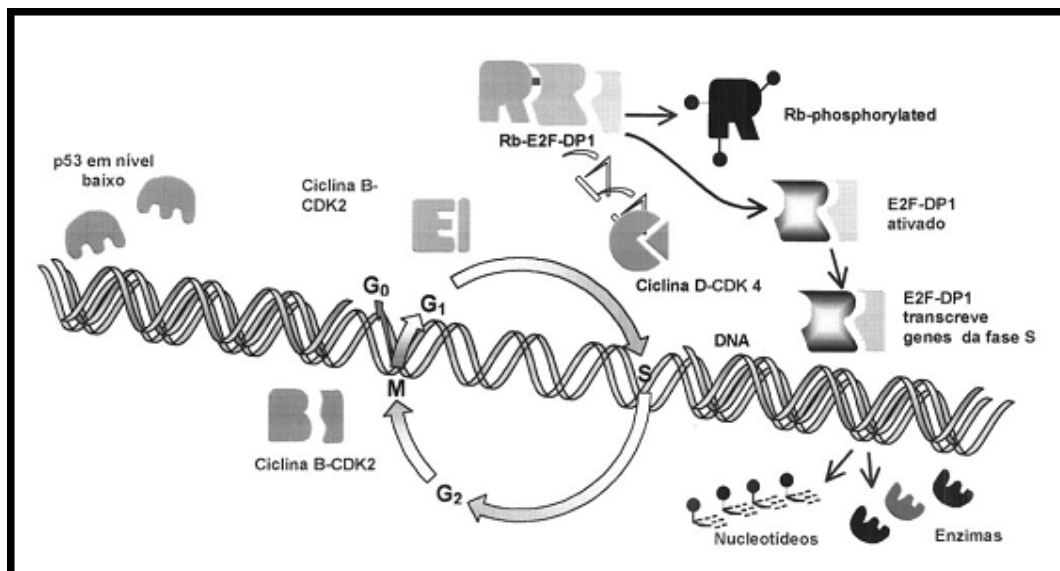


FIGURA 4 - PROGRESSÃO NORMAL DO CICLO CELULAR

FONTE: WARD (2002)

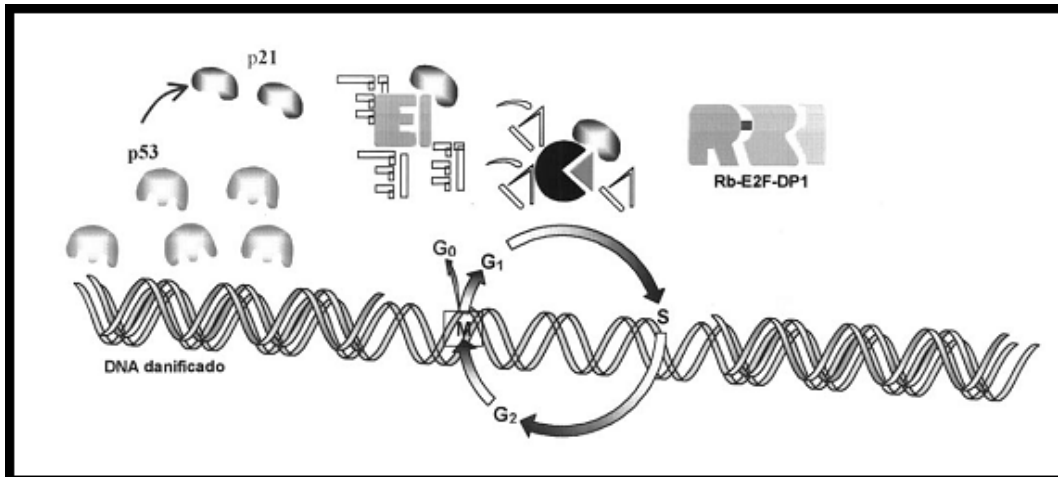


FIGURA 5 - PARADA DO CICLO CELULAR PARA REPARO DE DANOS AO DNA

FONTE: WARD (2002)

Anormalidades que podem ocorrer, tanto nos genes estimuladores de divisão celular, chamados de oncogenes, como também nos protetores ou bloqueadores do ciclo celular, chamados de genes supressores tumorais, podem conferir a uma célula vantagens de crescimento e desenvolvimento sobre as demais células. Cada uma das proteínas envolvidas no ciclo celular é codificada por um gene, sendo que mutações nestes genes podem levar à desregulação do ciclo celular. As proteínas que atuam de forma positiva, induzindo ou estimulando a progressão do ciclo, são codificadas pelos chamados proto-oncogenes, que ao sofrerem mutações se tornam oncogenes. Já as proteínas envolvidas no controle negativo do ciclo celular são codificadas pelos assim chamados genes supressores tumorais ( $p16^{\text{INK4a}}$ ,  $p19^{\text{ARF}}$ ,  $p21^{\text{Cip1}}$ ,  $p27^{\text{Kip1}}$ ,  $p53$ ). Mutações neste grupo de genes se manifestarão pela sua falta de ação, gerando um efeito final similar, perda dos mecanismos controladores do ciclo celular normal (WARD, 2002).

É interessante que todas as vias de sinalização redox dependente que modulam a reentrada no ciclo celular, eventualmente convergem para reguladores da atividade G1-CdK, como  $p16^{\text{INK4a}}$ ,  $p27^{\text{Kip1}}$  e ciclina D1 (BURHANS; HEINTZ, 2009).



No decorrer do ciclo celular, em G<sub>1</sub>, as ROS podem estimular caminhos mitogênicos que controlam a atividade das quinases dependente de ciclinas (CdK) e a fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb), regulando desse modo a entrada na fase S (BURHANS; HEINTZ, 2009).

Na fase S, ROS induzem a parada desta fase, através da fosforilação da proteína fosfatase 2A (PP2A) dependente da defosforilação da pRb (BURHANS; HEINTZ, 2009). A PP2A é importante na regulação de eventos durante o início da mitose (PFALLER; SMYTHE; NEWPORT, 1991) e inibição da fusão de vesículas endocíticas (WOODMAN *et al.*, 1992). ROS podem também levar a ativação de proteínas, como é o caso da p21<sup>Cip1</sup>, que é ativada em resposta a muitos fatores de estresse, sendo essa proteína responsável pelo bloqueio da progressão do ciclo celular através da inibição da G1- e S-CdKs (GARTEL; RADHAKRISHNAN, 2005).

### 2.3 SENESCÊNCIA CELULAR

A senescência celular é definida pela perda irreversível do potencial de divisão das células somáticas com uma variedade de alterações fenotípicas. Esse processo foi descrito pela primeira vez por Hayflick; Moorhead (1961) em um estudo com fibroblastos humanos normais em que eles eram capazes de entrar em um estado de repressão irreversível de crescimento após o cultivo *in vitro*.

Células de um tumor não entram nesse estado de parada do crescimento, como as células senescentes, e proliferaram por tempo indeterminado (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961). Desta forma, o poder antiproliferativo da resposta de senescência celular coloca claramente este processo como um supressor do mecanismo tumoral (COLLADO; BLASCO; SERRANO, 2007).

Células senescentes têm como característica uma parada de ciclo na fase G1 e uma proporção significativamente reduzida da razão núcleo-citoplasma (tamanho do genoma/massa celular) em relação às células em atividade no ciclo celular. Com relação ao fenótipo celular, o estado quiescente de células senescentes difere da quiescência induzida pela inibição da

densidade, a primeira está associada com uma redução na proporção núcleo-citoplasma, enquanto o último é associado com um aumento da razão núcleo-citoplasma. Essas características que as células desenvolvem quando estão senescentes podem ser estimuladas por vários fatores, podendo ser sinais intrínsecos e extrínsecos (STEIN *et al.*, 1999).

Nos estudos de Medrano *et al.*, (1994) foi observado que a cultura primária de melanócitos humanos entrava em senescência quando cultivada em meio enriquecido com PMA (forbol 12-meristato 13-acetato), que é um agente que estimula a proliferação desse tipo celular e é utilizado com frequência para enriquecer o meio de cultura dessas células. Os mesmos autores mostraram que essas células tiveram diversas modificações fenóticas em resposta à senescência, tais como o aumento do número de núcleos, morfologia alterada, aumento no número de melanossomos e aumento da deposição de melanina nas células (MEDRANO *et al.*, 1994).

Segundo Harley; Futcher; Greider (1990); Wei; Wei; Sedivy (1999); Shay; Wright (2001); Campisi (2003); Mooi; Peerper (2006) o encurtamento e eventuais disfunções dos telômeros também levam as células à senescência.

Algumas proteínas que podem desencadear o processo de senescência celular, também estão relacionadas com o desenvolvimento normal do ciclo celular, que Segundo Collado; Serrano (2006) são codificadas por genes regulados em resposta a estresse oncogênico; são elas as proteínas p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p19<sup>ARF</sup>, p21<sup>Cip1</sup> e p27<sup>Kip1</sup>.

Foi mostrado que a p16<sup>INK4a</sup> pode ser um indutor da senescência celular em fibroblastos humanos primários (Lin *et al.*, 1998) e que o aparecimento do fenótipo de senescência correlaciona-se com a produção tanto de p16<sup>INK4a</sup> como de p53.

Observa-se acúmulo de p16<sup>INK4a</sup> em culturas de células senescentes (DIMRI, 2005), porém, evidências recentes sugerem que *INK4a* sozinho pode não ser suficiente, e deve haver um outro fator que colabora ou fatores que podem ser necessários para executar o programa de senescência (MOOI; PEEPER, 2006).

Os resultados de Poêle *et al.*, (2002) sugerem que a p53 e a p21<sup>Cip1</sup> desempenham um papel central no início da senescência, enquanto que a função p16<sup>INK4a</sup> pode estar envolvida na manutenção da senescência.

Além da atividade da p16, p19, p21, p27 e p53, alguns autores citam que a senescência celular replicativa também exige a atividade da pRb. A pRb e a p53 são conhecidas como supressores tumorais que regulam as vias celulares que podem sofrer mutações, na maioria, senão em todos os cânceres de mamíferos (SERRANO *et al.*, 1997; DIMRI; ACOSTA; CAMPISI, 2000). Apesar de p53 e pRb serem necessárias para o estabelecimento da parada do crescimento, as funções precisas de cada uma não são totalmente compreendidas. A p53 reconhece os telômeros disfuncionais e DNA danificado, desencadeando assim a resposta de senescência, acredita-se que, pelo menos em parte, isso se deve ao aumento da expressão da quinase p21-dependente de ciclina (inibidor CdKl); a p21<sup>Cip1</sup> por sua vez impede a fosforilação e inativação da pRb (SHERR; ROBERTS, 1999).

Assim, embora a p53 e pRb possam interagir em suas vias de sinalização, elas também podem agir separadamente para manter a senescência celular (STEIN *et al.*, 1999). A p16<sup>INK4a</sup> pode limitar a proliferação de células por um mecanismo distinto do utilizado por p53. Além disso, a expressão da telomerase, enzima que adiciona sequências teloméricas, não protege as células de senescência replicativa, sugerindo que a expressão e a função da p16<sup>INK4a</sup> são independentes do estado dos telômeros (KIYONO *et al.*, 1998).

Os resultados de Beauséjour *et al.*, (2003) sugerem que a detenção da senescência causada por disfunção do telômero é reversível, sendo mantida principalmente pela p53 e revertida por inativação da p53. Em algumas células humanas, no entanto, p16<sup>INK4a</sup> fornece uma posição dominante, aparentemente irreversível, que não pode ser completamente superada pela inativação posterior da p53. Os mesmos autores concluem ainda que a p16<sup>INK4a</sup> é crucial para garantir a irreversibilidade da senescência, coerente com o seu importante papel na supressão tumoral. Como conclusão, os autores citam que deve existir uma distinção de dois tipos de senescência, uma reversível, mediado por p53 e uma irreversível mediada pela ação concomitante do *INK4a*/Rb e vias

com p53 (BEAUSÉJOUR *et al.*, 2003). Esta informação é importante, pois mostra que a senescência replicativa de células humanas não é necessariamente irreversível quando estabelecida.

Maier *et al.*, (2004) revelaram que o efeito duplo de p53 no envelhecimento e na tumorigênese parece depender da intensidade da atividade da p53. Camundongos manipulados geneticamente para expressar constitutivamente p53 têm maior proteção contra o desenvolvimento de tumor do que camundongos do tipo selvagem, enquanto que ao mesmo tempo demonstram sinais de envelhecimento precoce. Para Lin *et al.*, (1998) quando ocorre níveis normais ou moderados de danos, como durante o envelhecimento fisiológico, haverá a eliminação de danos por p53. Em contraste, a atividade descontrolada da p53 ou a presença de grandes danos ao DNA, resulta na eliminação excessiva de células por p53 que esgota a capacidade de regeneração dos tecidos, levando ao envelhecimento precoce (LIN *et al.*, 1998).

Outros agentes que podem interferir na atividade dessas proteínas regulatórias do ciclo celular e senescência são as espécies reativas de oxigênio (ROS), desencadeando respostas senescentes em células (FINKEL, 2003; COLAVITTI; FINKEL, 2005).

Essas espécies são associadas à senescência replicativa telômero-dependente, ao estresse, ou ainda, à senescência induzida por oncogenes (RAMSEY; SHARPLESS, 2006). Para Zglinicki (2002), ROS aceleram o encurtamento dos telômeros (ZGLINICKI, 2002) e podem danificar o DNA e, assim, induzir diretamente danos ao DNA e senescência (CHEN *et al.*, 1995; RAI *et al.*, 2008). Inversamente, a ativação de efetores downstream de danos ao DNA e checkpoints na senescência pode induzir a produção de ROS (MACIP *et al.*, 2003). Assim, as relações de causa-efeito entre ROS celular e a senescência ainda não são suficientemente claras.

Resultados dos estudos de Johnson *et al.*, (1996) sugerem que ROS e os antioxidantes podem agir nos níveis de p53 e que o alto nível de expressão dessa proteína leva as células a um aumento do nível de ROS intracelular (JOHNSON *et al.*, 1996). Posteriormente a esses estudos, foi observado que, em algumas células, embora altos níveis de p53 induzam apoptose, níveis de

expressão da p53 ligeiramente menores podem desencadear uma resposta senescente, com parada do crescimento (MACIP *et al.*, 2003). Condizente com esses resultados, Macip *et al.*, (2003) mostram que a superexpressão de p53 e p21<sup>Cip1</sup> resultou em um aumento de ROS intracelular e induziu a senescência celular.

Um número de estudos sugere que as interações das ROS com a rede de G1-CdK/CKI têm um papel fundamental na senescência celular, que é considerada uma barreira à tumorigênese (BURHANS; HEINTZ, 2009).

Nos estudos de Chen *et al.*, (1998) foi observado que o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em cultura de células primárias levou as células ao processo de senescência celular. Curiosamente, a concentração elevada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e outras espécies reativas, parecem ser um gatilho ao processo de apoptose e, em concentrações mais baixas, parecem favorecer a senescência. Chen *et al.*, (1998) também destaca que baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzem o aumento dos níveis de p53 e o consequente aumento de p21<sup>Cip1</sup>, levando à parada do ciclo celular em G1.

No trabalho de Percival e Dodge (1983) foi mostrado que o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> gerado por fotossensibilização levou células vegetais a uma parada do ciclo (senescência).

No trabalho de Passos *et al.*, (2010) foi analisado o papel das ROS no estabelecimento da senescência iniciado por danos ao DNA ou disfunções dos telômeros, e foi demonstrado uma existência de uma feedback (retroalimentação) positivo entre dano ao DNA e a produção de ROS. Os mesmos autores concluem que as ROS contribuem para a manutenção de focos de danos ao DNA em longo prazo, e isto é necessário e suficiente para manter a detenção da proliferação, em resposta ao dano no DNA durante a criação de um fenótipo de senescência irreversível. Ainda para os autores, os resultados fornecem evidências experimentais de que a sinalização dependente de ROS é necessária para o estabelecimento da senescência irreversível das células (PASSOS *et al.*, 2010). Estes resultados podem ser relevantes para estudos terapêuticos com ROS, com o objetivo de modular os seus níveis intracelulares no envelhecimento e no câncer.

Um dado importante com relação ao envelhecimento e o câncer, é que os genes envolvidos na transformação celular parecem também estar envolvidos na regulação de ROS intracelular (VAFA *et al.*, 2002). Para Colavitti e Finkel, (2005) essas observações argumentam contra um modelo em que oxidantes funcionam de uma forma aleatória e sugerem um papel específico para ROS na indução da senescência celular. Embora a relevância da senescência celular ao envelhecimento global continua a ser uma controversa, os autores acreditam que essas observações podem ter implicações importantes no modo como as espécies reativas contribuem para o envelhecimento do organismo.

Os estudos de Ha *et al.*, (2007) identificaram um subconjunto de células em senescência precoce em melanomas decorrentes de exposições a irradiações UV em ratos transgênicos, evidenciado pela coloração positiva, com a senescência associada a  $\beta$ -galactosidase ácida ( $\beta$ -Gal). A avaliação da senescência pela medida da atividade da  $\beta$ -galactosidase ácida é muito utilizada. A maioria das células expressam uma  $\beta$ -galactosidase lisossomal, que possui atividade ótima em pH em torno de 4, entretanto, em células senescentes a  $\beta$ -Gal apresenta maior atividade em pH em torno de 6, servindo como um marcador de senescência em várias linhagens celulares (DIMRI *et al.*, 1995). Um dado importante sugerido por Dimri *et al.*, (1995) é que este ensaio de identificação de células senescentes poderia servir como um marcador biológico do envelhecimento. Porém, cita que outros estudos são necessários para determinar como a  $\beta$ -Gal pode ser relacionada com outros sinais fisiológicos de idade e para mostrar que as células senescentes de fato contribuem para patologias relacionadas à idade (DIMRI *et al.*, 1995).

## 2.4 MELANÓCITOS E MELANOMA

Os melanócitos são células localizadas na camada basal da epiderme. No final do período embrionário, as células da crista neural migram para o mesênquima da derme em desenvolvimento e se diferenciam em melanossomos. Estes, mais tarde, migram para as junções dermo-epidérmicas e se diferenciam em melanócitos. Os melanócitos penetram na epiderme em

desenvolvimento e permanecem como células independentes, não se unindo aos queratinócitos por desmossomos (KIERSZEMBAUM, 2004; MOORE, 2008).

Os melanócitos são responsáveis pela melanogênese, um processo de síntese do pigmento melanina, esse processo ocorre nas organelas chamadas melanossomos (ORLOW *et al.*, 1994). A síntese da melanina começa com a oxidação enzimática de L-tirosina à L-Dopa e oxidação de L-Dopa à dopaquinona. Com a transformação espontânea da dopaquinona em leucodopacromo e dopacromo, então, inicia-se uma cascata bioquímica, com a formação de pigmento castanho-preto chamado eumelanina. A conjugação de dopaquinona, com cisteína ou glutathione, resulta em cisteinildopa e glutathionildopa. Ambas passam por uma série de transformações, gerando finalmente um pigmento vermelho-amarelo chamado feomelanina (OLIVEIRA; JUNIOR, 2003).

A melanina é considerada responsável pela proteção da pele contra os efeitos danosos da radiação UV nos queratinócitos (KADEKARO *et al.*, 2003), pois o pigmento absorve e dissipa a energia da radiação (ISSELBACHER *et al.*, 1994; SLOMINSKI *et al.*, 2004; MILLER; MIHM, 2006; GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

Os danos ao DNA da célula podem ser muito prejudiciais para os melanócitos, pois são células com baixa capacidade de renovação, e essa característica de baixo poder de renovação leva as células a terem deficiência em manter a integridade do seu genoma, ter problemas de sobrevivência, e, principalmente e mais importante, evitar sua transformação maligna para o melanoma (KADEKARO *et al.*, 2003); portanto, os melanócitos são os precursores do melanoma, a forma mais letal de câncer de pele (ISSELBACHER *et al.*, 1994; SLOMINSKI *et al.*, 2004; MILLER; MIHM, 2006; GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

Segundo o INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA, 2010), o câncer de pele é um dos tipos de câncer mais comuns nos países desenvolvidos, chegando a 25% de todos os tipos de neoplasias registradas no Brasil. O melanoma cutâneo tem predominância em adultos brancos e é considerado a forma mais agressiva dos diferentes tipos de câncer de pele.

Apesar da sua baixa incidência, somente 4%, é o câncer de pele que mais leva o portador ao óbito devido a sua alta possibilidade de sofrer metástase (HA *et al.*, 2007; FOUNDATION SKIN CANCER, 2010; INCA, 2010).

Desta forma, cada vez é mais válido a contribuição de pesquisas para compreender os mecanismos de iniciação e progressão do melanoma, visto que sua incidência vem aumentando continuamente durante várias décadas, como também, novas terapias que possam melhorar a qualidade de vida dos portadores da doença.

Para os melanócitos sofrerem transformações malignas e formarem o melanoma, eles produzem proteínas de superfície celular que possibilitam a sua interação com outros tipos celulares como fibroblastos e células endoteliais. Durante a transformação e progressão dos melanócitos em melanoma ocorrem alterações na comunicação dos melanócitos com as células do seu microambiente resultando em alterações da proliferação normal dos melanócitos. O principal responsável por esse desequilíbrio que leva a formação do melanoma é o acúmulo de alterações gênicas, o qual tem sido relacionado à progressão do melanoma maligno (BOGENRIEDER; HERLYN, 2002), além de mutações em genes reguladores do crescimento, alterações na produção de fatores de crescimento parácrinos e perda de moléculas de adesão, como caderinas, também contribuem para interromper a sinalização celular (HASS; SMALLEY; HERLYN, 2004).

A progressão tumoral, desde o aparecimento de uma displasia até a formação de um melanoma metastático, envolve uma série de processos, dentre eles: crescimento do tumor primário, vascularização, invasão para os tecidos circundantes, penetração nos vasos sanguíneos ou linfáticos, circulação e disseminação, adesão às células endoteliais ou membrana basal, extravasamento dos vasos, migração e crescimento nos órgãos alvo. Essa cascata de processos complexos, que culminam com a metástase, requer a participação dos produtos de vários genes (BOGENRIEDER; HERLYN, 2002).

Dentre os genes que são requeridos para os processos de cascata da progressão do melanoma estão os proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo do DNA. Alteração em um ou mais destes grupos cooperam na indução da condição neoplásica. Os proto-oncogenes são



importantes para o crescimento e divisão celular, os genes supressores de tumor atuam no atraso do ciclo celular e ativação da morte celular regulada e os genes de reparo atuam na correção de alterações no DNA, ação auxiliada também pelos proto-oncogenes. Portanto, são necessárias muitas alterações genéticas para o estadiamento do melanoma, sendo que essas alterações gênicas possuem correlações com a incidência no desenvolvimento do câncer (BENJAMIN; ANANTHASWAMY, 2007).

As aberrações genéticas e epigenéticas relacionadas com o desenvolvimento do melanoma metastático incluem inativação do gene *CdKN2A* por exclusão, mutação, ou metilação do promotor (SERRANO *et al.*, 1997; DAHL; GULDBERG, 2007). Esse gene, *CdKN2A* (cyclin-dependent kinase inibitor 2A), codifica duas proteínas distintas, mas relacionadas: p16<sup>INK4a</sup> e p14<sup>ARF</sup> (chamada de p19<sup>ARF</sup> em camundongos), envolvidas na regulação do ciclo celular, apoptose e também no desenvolvimento do melanoma (SERRANO *et al.*, 1997; GOVINDARAJAN *et al.*, 2007; HA *et al.*, 2007; NELSON; TSAO, 2009).

Ambas, p16<sup>INK4a</sup> e p14<sup>ARF</sup> demonstraram atividade supressora de tumor por caminhos distintos, a p16<sup>INK4a</sup> através da via que envolve a proteína Rb (Retinoblastoma) e a p14<sup>ARF</sup> através da via que envolve a proteína p53 (SHARPLESS; DEPINHO, 1999). Várias linhas de evidências mostram que, tanto p16<sup>INK4a</sup>, quanto p14<sup>ARF</sup> desempenham um papel na supressão do melanoma *in vivo* (RIZOS *et al.*, 2001).

Quando ocorre a perda não só da p19<sup>ARF</sup>, mas também da p16<sup>INK4a</sup>, ocorre o desenvolvimento de uma variedade de tumores, mas curiosamente, não o melanoma, mostrado por camundongos onde a atividade *CdKN2A* foi excluída (SERRANO *et al.*, 1996), já os animais especificamente deficientes para p16<sup>INK4a</sup>, mas que conservam uma cópia da p19<sup>ARF</sup>, tem indução de melanoma metastático (SHARPLESS *et al.*, 2001).

Para Peris *et al.*, (1999) uma mutação pontual em p16<sup>INK4a</sup> estaria envolvida com o melanoma em seres humanos, Walker *et al.*, (1998) citam que 50% dos melanomas humanos tem a perda do locus *CdKN2A*.

A p27<sup>Kip1</sup> também está relacionada com o desenvolvimento do melanoma, e foi mostrado nos estudos de Liu e Yamauchi (2009) que o tratamento com um

composto natural (inokitiol) aumentou os seus níveis, ocasionando uma inibição na proliferação de células de melanoma, mostrando o seu importante papel na proliferação dessas células.

Além do envolvimento de diversas proteínas no desenvolvimento, supressão e proliferação do melanoma, alguns estudos mostram ainda que a malignização do melanócito está diretamente ligada a exposição crônica à radiação solar, levando à formação do melanoma. Entretanto, o comprimento de onda exato causador dessa malignização ainda é desconhecido. Os estudos de Setlow *et al.*, (1993) mostraram que aproximadamente 95% dos peixes do gênero *Xiphophorus*, apresentaram indução de melanoma pela luz UV-A (320nm) e regiões da luz visível (405 e 436nm).

Segundo Piepkorn (2000), a relação entre p16<sup>INK4a</sup> e o melanoma pode ser explicado pela observação de que a luz UV pode induzir a expressão de p16<sup>INK4a</sup> em melanócitos humanos (PIEPKORN, 2000), implicando assim um papel para p16<sup>INK4a</sup> no reparo de lesões induzidas por UV. Porém, ainda não há uma clareza sobre os mecanismos moleculares, fisiológicos, genéticos e as interações dessa proteína com a luz UV.

Foi demonstrado, nos estudos de Kannan *et al.*, (2003), que o tratamento UV neonatal em camundongos acelerou a formação do melanoma. Este aumento da tumorigênese é acompanhado pelo aumento da amplificação de CdK6 com perda exclusiva de p16<sup>INK4a</sup>, o que não é visto nos tumores dos camundongos não tratados com UV (KANNAN *et al.*, 2003).

## 2.5 TERAPIA FOTODINÂMICA

Diante dos graves efeitos colaterais e da eficiência limitada das terapias tradicionais para o câncer (cirurgia, quimioterapia e radioterapia), alternativas estão sendo constantemente desenvolvidas na área da oncologia. Dentre todas, destaca-se a terapia fotodinâmica (PDT), uma modalidade relativamente nova para o tratamento de cânceres. Segundo alguns autores, apesar do uso da PDT ser centrada nesta doença, outras moléstias podem ser tratadas, tais como: degeneração macular da retina, psoríase, e verrugas, tendo como característica comum um crescimento anormal de tecidos igualmente ao câncer

(ABRAMSON *et al.*, 1992; LEVY, 1995; INSTITUTE OF MOLECULAR & CELLULAR BIOLOGY, 2010). Assim a PDT está sendo usada e investigada em nível mundial no tratamento de muitas doenças correlatas na origem (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

As primeiras experiências visando a aplicação do efeito fotodinâmico no tratamento de tumores em humanos foram feitas em 1903 por Tappenier; Jesionek, empregando eosina como fotosensibilizador (TAPPENIER; JESIONEK, 1903). Nos anos 70, a partir dos trabalhos de Dougherty *et al.*, (1978) a PDT passou a ser reconhecida como uma alternativa para o câncer, tendo sido empregada com sucesso no seu tratamento, e no tratamento de outras condições clínicas (SMETANA *et al.*, 1994; RICHTER *et al.*, 1994).

Nenhum efeito mutagênico sobre as células sadias havia sido reportado até a década de 80 (GOLDSTEN *et al.*, 1985) o que ampliou a segurança de aplicação dessa modalidade terapêutica, podendo ainda a repetição do tratamento no caso de reaparecimento do tumor ou mesmo de lesões extendidas (NSEYO, 1992). Essa repetição do tratamento por várias vezes é devido a ausência de efeitos colaterais associados ao agente fototerapêutico, com exceção de uma fotosensibilidade geral da pele, o que pode ser útil no caso de lesões múltiplas ou neoplasias metastáticas (MACHADO, 2000).

A base dessa terapia é uma combinação de uma droga, que age como sensibilizador, mais a luz (STERNBERG; DOLPHIN, 1996; KOLAROVA *et al.*, 2007). Após o composto fotossensível ser introduzido no paciente, esse se acumula preferencialmente em células que se reproduzem rapidamente, que posteriormente serão irradiadas com fontes luminosas (lasers, LEDs, lâmpadas comuns) que interajam com o corante. Assim, a luz ativa o composto, gerando espécies reativas de oxigênio tóxicas que afetam convenientemente o tumor, levando à morte do tumor e à ação curativa do paciente (STERNBERG; DOLPHIN, 1996; KOLAROVA *et al.*, 2007).

Para Oleinick, Morris e Belichenko (2002), a PDT pode levar as células a dois processos de morte celular, apoptose e necrose, isso vai depender da célula e do fotossensibilizador. Acredita-se que a morte do tecido decorre também através do comprometimento do sistema de irrigação tumoral (sistema

vascular) que faz o transporte dos nutrientes necessários ao crescimento rápido do tumor (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

Essa difusão do dano nas vizinhanças do tecido afetado, iniciado por reações bioquímicas, resulta em danos de diferentes proporções à célula tumoral inviabilizando-o. Esse efeito é devido às espécies reativas geradas a partir da interação entre o estado excitado do corante e o oxigênio, e entre o estado excitado do corante e sítios dos substratos que estão sendo atacados, e ainda, das resultantes dos processos secundários, que produzem radicais livres e outras espécies carregadas (MACHADO, 2000).

Assim, para que ocorra a produção de espécies reativas na PDT, a presença do oxigênio molecular é fundamental (AVELINE; HASAN; REDMOND, 1995), e o oxigênio no estado triplete ao suprimir a energia do sensibilizador irá gerar  $^1\text{O}_2$ . Essa geração de  $^1\text{O}_2$  é um dos mecanismos que atuam na PDT, denominada tipo II, o outro mecanismo é o tipo I, que é quando o fotossensibilizador excitado transfere um elétron para uma molécula produzindo espécies radicalares (OLEINICK; MORRIS; BELICHENKO, 2002).

Em 1976 Weishaupt, Gomer e Dougherty postularam que o  $^1\text{O}_2$ , gerado por sensibilização era o agente citotóxico responsável pela desativação de células tumorais. Contudo, não existe certeza absoluta de que o  $^1\text{O}_2$  seja o responsável pela fototoxicidade, uma vez que, dependendo das condições, a fotossensibilização pode também levar à formação de radicais livres tais como: o  $\text{O}_2^{\cdot -}$  e  $\text{OH}^{\cdot}$  via reação de Fenton, sendo que esses poderiam ocasionar fototoxicidade no tecido (HADJUR *et al.*, 1997). Segundo Burguete *et al.*, (2009) o  $^1\text{O}_2$  tem grande aplicação fotodinâmica na destruição de células de melanoma (B16-F10), visto pelos seus resultados com a utilização de um poro monolítico associado ao RB, que após fotossensibilização, leva a um aumento na mortalidade das células de melanoma que o autor atribui como morte por apoptose, observado por microscopia de fluorescência.

Algumas características importantes devem ser levadas em conta com relação às substâncias fotossensibilizadoras utilizadas na PDT: devem possuir toxicidade baixa no escuro e tendência elevada a acumular-se nos tecidos doentes, evitando assim que as células vizinhas iluminadas sejam danificadas (STERNBERG; DOLPHIN, 1996; DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN

SERVICES, 2010). As quantidades aplicadas de medicamento e as características do laser e de outras fontes luminosas (tipo, dosagem de potência e tempo de iluminação) dependem do fotossensibilizador que está sendo aplicado e da espécie e gravidade da doença tratada (MACHADO, 2000).

Alguns fotossensibilizadores que são utilizados na prática experimental são o Azul de Metileno, o Rosa Bengala, a Fenalenona e o meso-Tetrafenil Porfirina. Sendo que o melhor composto é aquele que possui um alto coeficiente de absorção na região espectral da luz de excitação e um alto rendimento quântico para geração do  $^1\text{O}_2$ . O Rosa Bengala e Azul de Metileno são dois corantes que são captados por células e produzem  $^1\text{O}_2$  eficientemente, e são relativamente não tóxicos para as células na ausência de luz (KOCHEVAR; REDMOND, 2000).

O Rosa Bengala (RB) é um importante fotossensibilizador utilizado para geração do  $^1\text{O}_2$ , isso se deve a sua estrutura que é formada por um haletto derivado da fluoresceína, utilizado para o diagnóstico de doenças. Seu mecanismo fotodinâmico (na PDT) consiste na formação de 80% de oxigênio singlete e 20% de ânion superóxido com absorção de luz na faixa de 450-600 nm (PAULINO *et al.*, 2005; PERUSSI, 2007). O potencial fotodinâmico do Rosa Bengala em bactérias Gram positivas e negativas já foi demonstrado em alguns estudos (TEGOS *et al.*, 2008).

Nos estudos de Woodburn *et al.*, (1998), foi realizada a PDT em tumores de melanoma, induzidos por células B16-F10 que foram injetadas em camundongos, gerando aumento na apoptose celular, retardo na evolução do tumor e aumento na sobrevivência dos camundongos.

Os resultados do trabalho de Bloznelyte-Plesniene e Rutkovskiene (2007) mostram que a PDT, (utilizando para indução luz azul-violeta-378-426nm, e como fotossensibilizador derivados de hematoporfirina), proporciona necrose completa do melanoma humano, 7 a 10 dias após a sua realização. Os mesmo autores ainda concluíram em seu trabalho, que os resultados imediatos da PDT no melanoma depende da espessura do tumor, quando inferior a 22mm uma resposta completa foi notada. Também observaram que após 4

anos da aplicação da PDT no melanoma humano, não haviam mais evidências desse tumor.

Kolarova *et al.*, (2007) mostraram em seus estudos, uma diminuição da viabilidade celular de células de melanoma humano após a fotossensibilização, utilizando laser (674nm) e ftalocianina (substância fotossensibilizadora), com uma resposta dose-dependente com relação a concentração da substância fotossensibilizadora.

### 3. JUSTIFICATIVA

Considerando que a produção de ROS no organismo pode estar relacionada com o processo de envelhecimento, existe um interesse de melhor compreender os mecanismos da relação entre o papel dessas espécies reativas com a senescência celular e o processo de malignização. Além disso, as investigações à cerca deste assunto poderiam contribuir para esclarecer se as terapias que induzem a senescência seriam úteis no tratamento de câncer.

O melanoma humano é o mais grave câncer de pele e o mais resistente entre as neoplasias malignas. Nesse sentido, torna-se clara a importância de novas pesquisas a respeito do efeito de ROS no desenvolvimento desse câncer de pele, assim como na possibilidade destes efeitos serem explorados em terapias auxiliares.

Dessa forma, este trabalho avaliará o efeito de uma espécie reativa de oxigênio, especificamente o oxigênio molecular singlete, em células de melanócitos e melanoma com foco no processo de senescência celular.

Essa espécie reativa pode ser formada pela incidência da luz solar na pele e também pela terapia fotodinâmica como forma de tratamento de tumores, de forma que avaliando seus efeitos em relação à senescência em melanócitos e melanoma, pretende-se contribuir no entendimento desse processo na transformação celular e na resposta frente a essa terapia.

#### 4. OBJETIVOS

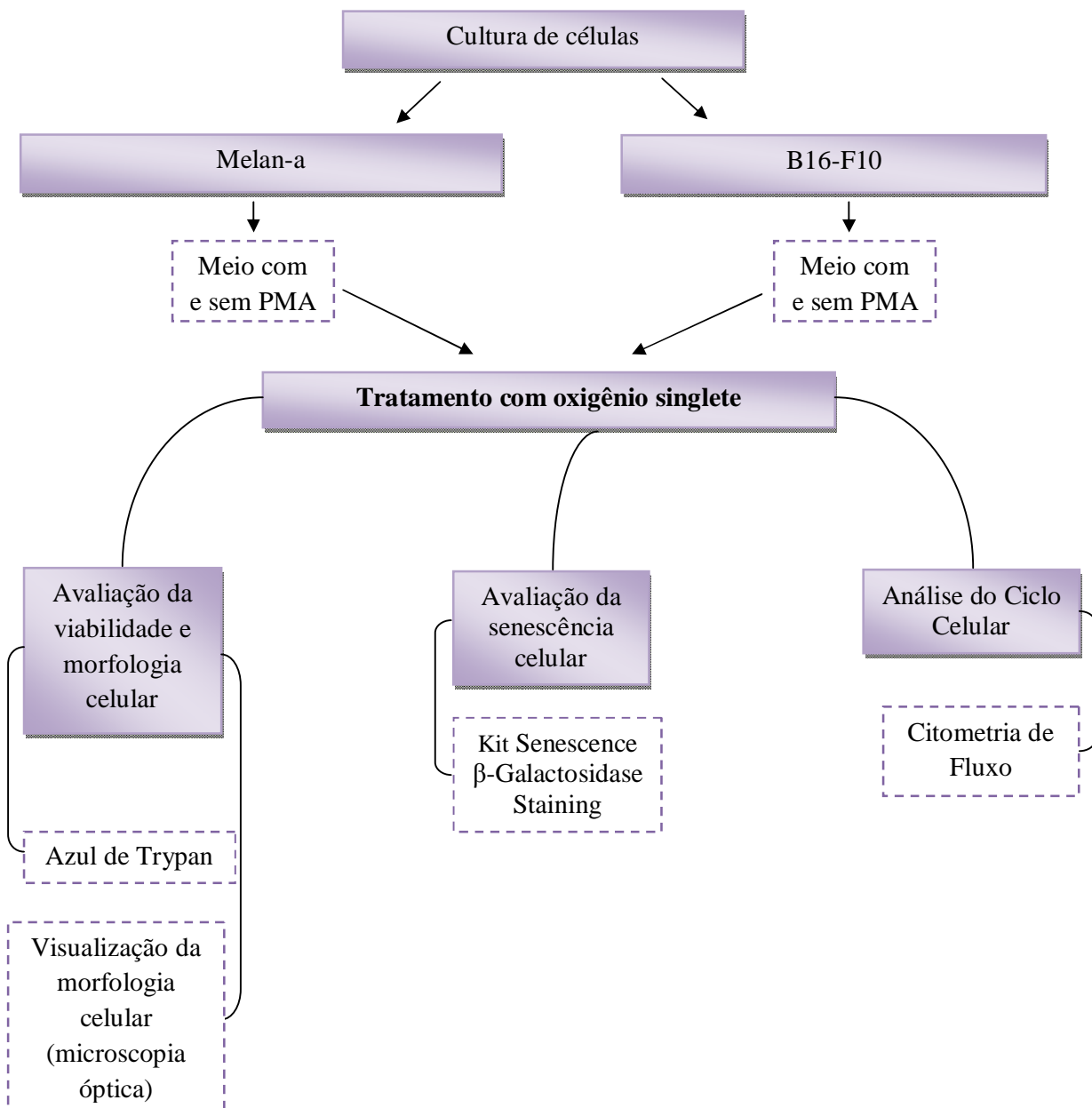
O objetivo geral deste trabalho é determinar se o oxigênio molecular singlete pode levar células de melanoma e melanócitos murinos ao processo de senescência celular

Objetivos específicos:

- Avaliar a viabilidade (24, 48, 72 e 96 h) e morfologia (48 h) de melanócitos e células de melanoma, após a exposição ao oxigênio molecular singlete;
- Avaliar a senescência celular de melanócitos e células de melanoma após 48 e 96 h da exposição ao oxigênio molecular singlete;
- Avaliar alterações no ciclo celular de melanócitos e células de melanoma após 48 e 96 h da exposição ao oxigênio molecular singlete.



## 5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 ESTERILIZAÇÃO DOS MATERIAIS

As vidrarias foram esterilizadas em autoclave (Fanem) a 120 °C, durante 45 min, sob pressão de 1 atm. Após a esterilização, o material foi levado para secagem em estufa (Fanem, São Paulo, Brasil, Modelo Orion 505) a 37 °C por 24 h.

### 6.2 LINHAGENS CELULARES

Foram utilizadas as linhagens celulares B16-F10 e Melan-a, melanoma e melanócito murino, respectivamente, que foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Roger Chammas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

#### 6.2.1 Condições de Cultivo das Células B16-F10 e Melan-a

Estas linhagens desenvolvem-se *in vitro* em monocamadas, são cultivadas em garrafas estéreis *Techno Plastic Products* (TPP) com meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab), acrescido de 7,5% de soro fetal bovino (SFB), 20 mmol/L de HEPES (pH 7,5) e 8 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, para ajustar o pH em 7,4 e 0,125% do antibiótico gentamicina. Dependendo do grupo experimental, foi ainda adicionado PMA (éster de Forbol 12-Miristato 13-Acetato, Sigma) 200 µmol/L. As garrafas com as culturas de células foram mantidas em estufa com temperatura constante de 37°C (Sanyo), em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, com umidade controlada de 95%. O meio foi trocado periodicamente, conforme a necessidade da cultura. Foram realizados repiques, semanalmente, conforme protocolo estabelecido no laboratório de cultivo celular, utilizando para desprender as células, solução de tripsina-EDTA (137 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl, 50 mg de tripsina 1:250, 5,4 mmol.L<sup>-1</sup> de KCl, 2,3 mmol.L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>, 5 mmol.L<sup>-1</sup> de glucose, 0,42 mmol.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,44 mmol.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,53 mmol.L<sup>-1</sup> de EDTA e 2% (p/v) de vermelho de fenol, pH em 7,4). Para o armazenamento,

alíquotas de  $10^6$  células.mL<sup>-1</sup> foram suspensas em meio de cultura com soro fetal bovino 10% (v/v) e DMSO 10% (v/v) e mantidas em *freezer* -80°C ou em nitrogênio líquido.

### 6.3 GERAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE - FOTOSSENSIBILIZAÇÃO

A geração do  $^1\text{O}_2$  foi feita por fotossensibilização segundo protocolo adaptado de Kochevar; Redmond (2000). Foi utilizado o corante Rosa Bengala na concentração de 0,5  $\mu\text{mol/L}$  e irradiação por 10 minutos com lâmpadas de mercúrio 500W (Philips) e utilizando-se filtro de vidro jateado e filtro de corte em 550 nm conforme mostrado na foto da FIGURA 6.

O Rosa Bengala é específico para formação de  $^1\text{O}_2$  nessas condições, pois quando irradiado entre 450-580nm gera especificamente o  $^1\text{O}_2$  (PERCIVAL; DODGE, 1983; ALLEN *et al.*, 1991; REDMOND; GAMLIN, 1999; WANG *et al.*, 2009; RAHMANTO *et al.*, 2010).

O  $^1\text{O}_2$  pode ser gerado nas células eucarióticas e procarióticas por ampliação e adaptação de métodos descritos em estudos em solução. Procedimentos especiais devem ser seguidos para manter a viabilidade celular e para eliminar efeitos devido ao solvente sozinho e o tratamento com a luz sozinha. Assim, foi modificado o protocolo de Kochevar e Redmond (2000) para determinar o tempo (10 minutos de irradiação) e a concentração do corante Rosa Bengala (0,5  $\mu\text{mol/L}$ ). Essa condição faz com que a viabilidade celular seja suficiente para análises de senescência celular.



FIGURA 6 – SISTEMA PARA FOTOSSENSIBILIZAÇÃO

FONTE: AUTOR (2011)

#### 6.4 VIABILIDADE CELULAR POR AZUL DE TRYPAN

Foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células por poço em meio RPMI suplementado com 7,5% de SFB, enriquecido ou não com PMA dependendo do grupo experimental e mantidas por 24 h em estufa para adesão. As células foram fotossensibilizadas para geração de oxigênio singlete e após 24, 48, 72 e 96 h foi realizado o ensaio de viabilidade celular com Azul de Trypan. Foram feitos controles no escuro (não irradiados) para todos os grupos experimentais.

Após remoção do meio, as células foram desprendidas com solução de tripsina-EDTA e então ressuspensas em meio RPMI. O corante Azul de Trypan foi preparado na concentração de 0,4% m/v em solução salina fosfato tamponada (PBS, constituída de  $680 \text{ mmol.L}^{-1}$  de NaCl,  $13,4 \text{ mmol.L}^{-1}$  de KCl,  $40,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e pH 7,4). Para cada mL da amostra, foi adicionado 0,1 mL do corante Azul de Trypan (proporção de 1:10 corante:amostra) e as células foram contadas em Câmara de Neubauer em microscópio óptico

(OLYMPUS, mod.KW1), considerando como células viáveis as não coradas e não viáveis, as coradas de azul, pois na técnica do Azul de Trypan, o corante se difunde rapidamente para dentro do citoplasma na célula morta, enquanto que, em uma célula viva, sua membrana plasmática não permite a penetração do corante (SPIKES, 1998).

A contagem das células foi realizada no máximo 4 minutos após a adição do corante. O percentual de viabilidade foi calculado conforme a equação:  $CV (\%) = (NC/(NC + C)) \times 100$ . Onde: CV, células viáveis; NC, células não coradas e C, células coradas pelo Azul de Trypan.

## 6.5 MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Durante os experimentos as células foram acompanhadas, por microscopia óptica em aumento de 100X (OLYMPUS, mod.KW1), para observar possíveis mudanças morfológicas, as imagens foram capturadas por um camera digital (Sony).

## 6.6 SENESCÊNCIA CELULAR POR $\beta$ -GALACTOSIDASE

Para análise da senescência celular foi utilizado o kit Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining (Cell Signaling). Foram plaqueadas  $1,5 \times 10^4$  células por poço em meio RPMI suplementado com 7,5% de SFB. Após 24 h as células foram fotossensibilizadas para geração do oxigênio singlete e, então, foi realizado o ensaio de senescência, 48 e 96 h após a fotossensibilização. Após esses tempos, foi removido o meio de crescimento das células e os poços foram lavados com 2 mL de PBS. As células foram fixadas com 1 mL de solução fixadora por 10-15 min em temperatura ambiente. Enquanto a placa estava com a solução fixadora, foi preparada a solução de coloração contendo: 930  $\mu$ L de solução de coloração, 10  $\mu$ L de solução corante complementar A, 10  $\mu$ L de solução corante complementar B, 50  $\mu$ L de X-gal 20mg/mL que foi diluído em DMF (*N,N*-dimethylformamide). Depois foram lavados os poços duas vezes com 2 mL de PBS e, então, foi adicionado 1 mL da solução de coloração nas placas, que foram incubadas *overnight* a 37°C. Após esse

período, as células foram observadas no microscópio (ampliação 100X total) para verificar a formação de coloração azul dentro da célula, por fim, as células foram contadas em 10 regiões distintas de cada poço. Dessa forma, foram quantificadas como células senescentes as coradas de azul e não senescentes as não coradas de azul, como mostra a FIGURA 7. Para o armazenamento em longo prazo, foi removida a solução de coloração e foi adicionado glicerol 70%, para conservação a 4°C.

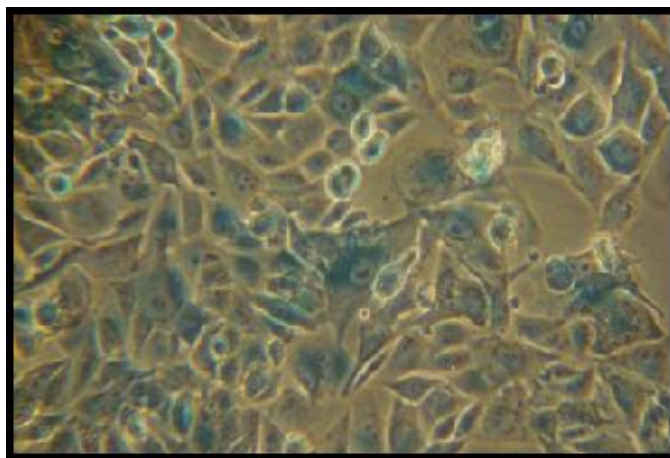


FIGURA 7 – MICROGRAFIA REPRESENTATIVA DAS CÉLULAS B16-F10 COM PMA APÓS 96 H DO TRATAMENTO COM  $^1O_2$ .

FONTE: Autor (2011)

NOTA: Micrografia representativa das células B16-F10 com PMA após 96 h da fotossensibilização com corante Rosa Bengala ( $0,5 \mu\text{mol/L}$ ) por 10 min a temperatura ambiente para geração do oxigênio singlete (aumento de 100X). Irradiação conforme descrito no item 6.3

## 6.7 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

Foram plaqueadas  $2,5 \times 10^5$  células por poço em placas de 60mm em meio RPMI suplementado com 7,5% de SFB. Após 24 h, as células foram fotossensibilizadas para geração do oxigênio singlete. Após 48 e 96 h da fotossensibilização foi realizada a coleta do material para análise. Primeiramente foi realizada a coleta do meio de cultura (sobrenadante) das células. Após esta retirada do meio, as células aderentes foram lavadas duas vezes com PBS, e o PBS da lavagem foi adicionado ao sobrenadante coletado. A seguir, as células aderentes foram tripsinizadas, e a suspensão de células tripsinizadas foi adicionada ao mesmo tubo de coleta anterior. Este material

(sobrenadante da cultura + suspensão de células que estavam aderentes) foi centrifugado (2000rpm, 5min), e o sobrenadante foi então descartado, permanecendo apenas o *pellet* de células. Posteriormente, foram adicionados ao *pellet* celular: 300µL de iodeto de propídeo (0,5 µg/mL), Citrato de Sódio (0,1%) e Triton X-100 (0,1%). O conteúdo de DNA de cada amostra foi analisado utilizando um Citômetro de Fluxo FC500 (FACS Calibur), onde os dados foram analisados através do programa MXP (*Software* padrão do equipamento).

## 6.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prism 5 Demo, sendo as repetições e os tratamentos avaliados pela análise de variância (ANOVA - “one-way”) e para avaliar as diferenças entre os grupos de células foi utilizado ANOVA - “Tukey”. A significância foi definida como  $p < 0,05$ .

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

#### 7.1.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS MELAN-A 24, 48, 72 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM OXIGÊNIO SINGLETE

Todos os experimentos foram realizados com controles no escuro denominados de não irradiados, que foram PBS não irradiado e com o corante Rosa Bengala (RB) não irradiado, os irradiados foram PBS ou RB irradiado, neste último é onde efetivamente tem-se a geração do  $^1\text{O}_2$ .

As células Melan-a crescem em meio enriquecido com o estimulador da proliferação celular, o PMA, e células B16-F10 não. Assim para comparar os resultados das duas células os experimentos foram realizados com e sem a adição do PMA em ambas as linhagens.

O PMA é responsável pela ativação da proteína quinase C (PKC) que auxilia na proliferação celular de culturas (ZHANG, *et al.*, 2005). A PKC está envolvida em vários eventos celulares, incluindo sobrevivência, proliferação e diferenciação (SANTOS *et al.*, 2003), sendo uma enzima de grande importância nos processos de transdução de sinal (NISHIZUKA, 1995). A via de sinalização dessa enzima controla a expressão de vários genes relacionados com o metabolismo celular (BANUETT, 1998) e também em processos relacionados com o desenvolvimento de câncer (KULANTHAIVEL, *et al.*, 1993). A atividade da PKC inicia-se com a fosfolipase C que hidrolisa o fosfatidil inositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em dois compostos de suma importância o diacilglicerol (DAG) e o inositol-1,4,5, trifosfato (ITP) (MAGALDI, 1996). O ITP liga-se a receptores específicos, localizados no retículo-endoplasmático, fazendo com que ocorra a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol. Esta liberação de cálcio para o citoplasma é importante para que aconteça a estimulação do DAG sobre a proteinoquinase C (PKC) (BREYER, ANDO, 1994), assim o DAG auxilia na ativação da PKC.

Diante do exposto acima, foi inicialmente verificado se seria possível fazer os experimentos sem a adição desse indutor de crescimento (PMA) nas



Melan-a. Entretanto, as células Melan-a cultivadas sem PMA não apresentaram crescimento satisfatório nos tempos analisados, sendo assim, os estudos com Melan-a foram mantidos apenas nas condições com PMA.

A viabilidade celular foi avaliada pela técnica de azul de trypan, que se baseia na exclusão do corante por células viáveis (PHILLIPS, 1973). Em razão do corante ser macromolecular, a possibilidade de ser absorvido pelos poros da membrana plasmática de células viáveis é muito baixa. Assim, quando há um comprometimento da membrana e esta se torna permeável ao corante, as células são coradas de azul. Dessa forma, foram quantificadas como células viáveis as não coradas e não viáveis as coradas de azul.

Na FIGURA 8 são mostrados os resultados da avaliação da viabilidade das células Melan-a com PMA após 24, 48, 72 e 96 h da fotossensibilização para geração do  $^1\text{O}_2$ . Os resultados estão expressos como porcentagem de células viáveis. Não foram observadas alterações da viabilidade dessas células em nenhum dos grupos experimentais nos diferentes tempos.

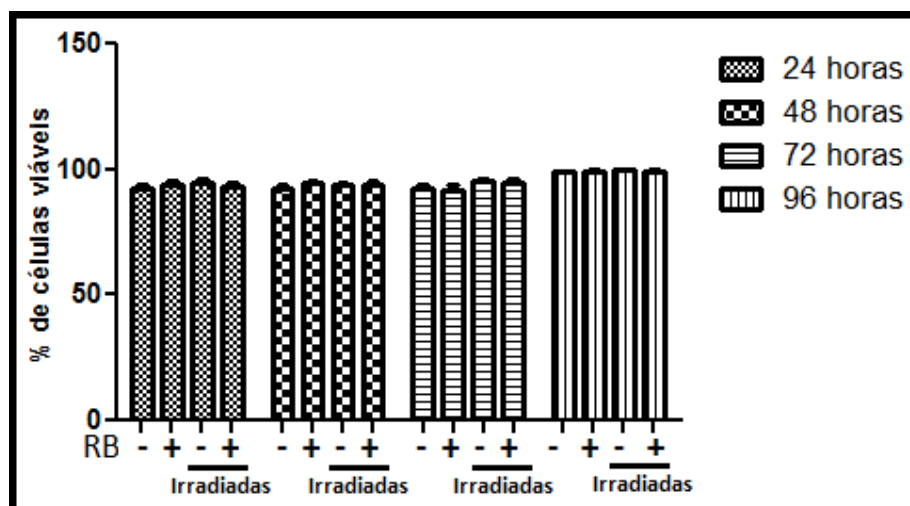


FIGURA 8 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS MELAN-A COM PMA 24, 48, 72 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: Autor (2011)

NOTA: Gráficos da viabilidade das células Melan-a com PMA após 24, 48, 72 e 96 h da fotossensibilização do corante Rosa Bengala ( $0,5\mu\text{mol/L}$ ) por 10 minutos a temperatura ambiente para geração do  $^1\text{O}_2$ . O resultado é representado pela média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A viabilidade celular foi analisada pela técnica do corante Azul de Trypan conforme item 6.4.

De encontro a estes resultados de viabilidade para Melan-a, Marchesi (2008) também mostrou que essas células não tiveram diminuição na viabilidade após serem expostas a uma espécie reativa, o óxido nítrico, gerado por irradiação na região do visível (480nm) por fotossensibilização.

#### 7.1.2 VIABILIDADE DAS CÉLULAS B16-F10 24, 48, 72 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM OXIGÊNIO SINGLETE

As células B16-F10, cultivadas nas condições com e sem PMA, foram plaqueadas e fotossensibilizadas para geração do  $^1\text{O}_2$ . Depois de transcorridos os tempos de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pela técnica de azul de trypan. Os resultados estão expressos como porcentagem de células viáveis.

Foi observada uma diminuição de 8,4% do número de células viáveis nas células B16-F10 com PMA não irradiadas com relação ao grupo PBS não irradiado sem PMA (FIGURA 9A). Estes efeitos permanecem até 48 h (6,1%)

(FIGURA 9B) e a viabilidade então é recuperada a partir de 72 h (FIGURA 9C). Acredita-se que essas células tenham essa discreta diminuição da viabilidade em presença do PMA devido ao fato dessa linhagem não ser comumente cultivada na presença do mesmo.

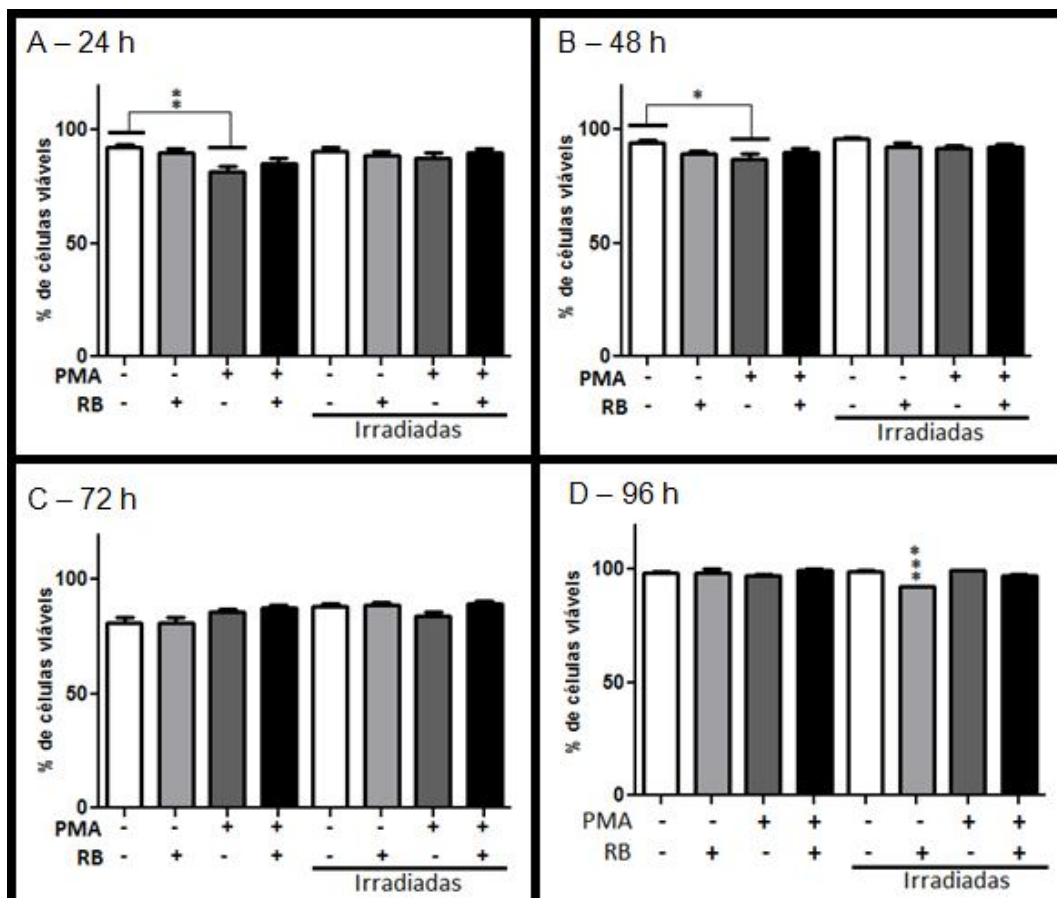


FIGURA 9 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS B16-F10 COM E SEM PMA APÓS 24, 48, 72 E 96 H DO TRATAMENTO COM  $^1O_2$ .

FONTE: Autor (2011)

NOTA: Gráficos da viabilidade das células B16-F10 com e sem PMA após 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 h (D) da fotossensibilização do corante Rosa Bengala ( $0,5\mu\text{mol/L}$ ) por 10 minutos a temperatura ambiente para geração do  $^1O_2$ . O resultado é representado pela média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. A viabilidade celular foi analisada pela técnica do corante Azul de Trypan conforme item 6.4. As significâncias estatísticas obtidas são referentes aos demais grupos no mesmo tempo experimental. One-Way ANOVA: Tukey. \*\*\* =  $p < 0.001$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \* =  $p < 0.05$ .

Alguns trabalhos discutem o efetivo papel do PMA em culturas celulares, pois ainda não há uma clareza de todos os seus mecanismos em diferentes linhagens celulares. Foi mostrado que o PMA pode diminuir a viabilidade de cultura primária de células do epitélio intestinal (10% de morte celular), evidenciado pelo método Azul de Trypan (TEPPERMAN, SOPER, CHANG, 2005), porém, outro estudo mostrou que o PMA pode conferir uma certa proteção, evitando dano ao DNA e o processo de apoptose de células causadoras de leucemia (KANEKO, IKEDA, NAKANISHI, 1999). Foi ainda mostrado que pode ocorrer uma inibição do crescimento e uma estimulação das funções de diferenciação de células de melanoma humano (HO) cultivadas na presença de PMA (HUBERMAN, HECKMAN, LANGENBACH, 1979) e que neutrófilos incubados na presença de PMA apresentam um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (TIAN *et al.*, 2005).

A PKC têm sido implicada em uma série de vias de sinalização celulares, incluindo alterações na integridade celular (DEMPSEY *et al.*, 2000). Foi mostrado que o aumento na atividade da PKC por diferentes indutores pode reduzir a viabilidade de alguns tipos celulares incluindo hepatócitos (JONES *et al.*, 1997), células neurais (PAVLAKOVIC *et al.*, 1995) e timócitos (YE *et al.*, 1993) e diminuir a proliferação das células da retina (SANTOS *et al.*, 2003).

Assim, já foi mostrado que o PMA pode levar a uma diminuição de viabilidade celular e, mais importante, inibição do crescimento de células de melanoma. O aumento da atividade da proteína PKC poderia levar a uma diminuição da viabilidade celular, isso explicaria possivelmente a diminuição da viabilidade das células B16-F10 com PMA não irradiadas, pois neste grupo as células são cultivadas em presença de PMA e dessa forma tem a atividade da PKC aumentada.

Um resultado interessante obtido em nosso estudo foi o fato das células B16-F10 com PMA e irradiadas não apresentarem diminuição na viabilidade celular em nenhum dos tempos analisados. Acreditamos que a irradiação possa ter modificado a resposta dessa linhagem ao PMA. De fato, Kaneko, Ikeda e Nakanishi (1999) realizaram irradiação com luz UV ( $0.1 \text{ J/m}^2$ ) em células de leucemia onde ocorria um aumento da apoptose celular, porém

quando estas células eram pré-incubadas com PMA, e então irradiadas, o processo de apoptose era inibido, mostrando assim, que ocorre uma mudança da resposta celular quando as células são irradiadas em presença do PMA

Outros resultados interessantes foram mostrados no estudo de Coppes *et al.*, (2005) que utilizaram células isoladas da glândula parótida, cultivadas em meio enriquecido com PMA, advindas de camundongos irradiados. As glândulas foram irradiadas com uma única dose de 15 Gy, com aparelho de raios-X. Foi observado que quando os animais eram irradiados, o PMA do meio era incapaz de induzir a translocação da PKC pela membrana, mostrando que a irradiação interfere especificamente na associação da PKC com as membranas levando à deficiência de sinalização intracelular.

Isso mostra que a irradiação pode mudar totalmente a resposta das células ao PMA, e assim, o poder de estimulação do PMA sobre a PKC. Isso poderia explicar a viabilidade das células B16-F10 com PMA e irradiadas.

A FIGURA 9D mostra os resultados da viabilidade celular após 96h do tratamento, onde se observa uma diminuição de 6,1% da viabilidade das células B16-F10 sem PMA e irradiadas em presença de RB. Esse resultado pode ser atribuído possivelmente a um efeito mais tardio do  $^1\text{O}_2$  gerado pela fotossensibilização.

Foi mostrado em vários estudos que o corante RB (Rosa Bengala) quando irradiado, entre 450-580nm, gera  $^1\text{O}_2$  (PERCIVAL, DODGE, 1983; REDMOND, GAMLIN, 1999; KOCHEVAR, REDMOND, 2000; WANG *et al.*, 2009; RAHMANTO *et al.*, 2010). O  $^1\text{O}_2$  é responsável por causar vários danos celulares, como mudanças na morfologia celular, diminuição da viabilidade, aumento do dano ao DNA, aumento da apoptose celular, todos em células de pele humana (ALI, RAY, HANS, 2010).

Danos ao DNA podem ativar a proteína p53 que é responsável por sinalizar se as células continuam a proliferar com esse dano ou sofram processos de apoptose ou senescência celular (GREENBLATT *et al.*, 1994; COLLADO; BLASCO; SERRANO, 2007). Portanto, se o  $^1\text{O}_2$  é capaz de causar dano ao DNA, essa diminuição da viabilidade das células B16-F10 sem PMA e irradiadas (FIGURA 9D) possivelmente pode ser relacionado com processos sinalizados pela ativação de p53.

Santos (2007) observou uma diminuição de 40% da viabilidade de células expostas ao  $^1\text{O}_2$ , gerado por DHPNO<sub>2</sub>, essa diferença da viabilidade com relação as células B16-F10 sem PMA RB irradiadas em 96 h pode ser atribuído a diferenças na geração de  $^1\text{O}_2$ , visto que a utilização de DHPNO<sub>2</sub> faz com que o  $^1\text{O}_2$  seja formado na ausência de luz. Além disso, as quantidades geradas dessa espécie reativa nas duas condições pode diferir significativamente.

Marchesi (2008) também encontrou uma diminuição da viabilidade de células B16-F10 expostas a uma espécie reativa, o óxido nítrico, gerado por irradiação na região do visível (480nm) por fotossensibilização.

Como a evidência da viabilidade celular é indireta, existem fatores que podem influir na sub ou superestimação dos resultados. Por exemplo, em caso de comprometimento da capacidade de crescimento ou da função celular, ainda que insuficiente para comprometer a integridade da membrana celular, haverá risco de concluir-se por um falso positivo quanto à viabilidade da célula. Do mesmo modo, resultados falsos negativos podem acontecer quando a membrana estiver comprometida e a célula ainda mantiver a capacidade de auto-reparação, apresentando-se inviável no momento do exame. Um aspecto importante a ser considerado a respeito dos agentes citotóxicos está no fato de que em geral esses agentes atuam em estruturas e processos que antecedem o dano irreversível da membrana plasmática (STROBER, 2001).

Diferenças nas condições de cultivo, como confluência celular, podem interferir em parâmetros celulares relacionados com a resistência a diferentes tratamentos (CARRETERO *et al.*, 1999).

Levando em consideração a responsividade da linhagem ao tratamento com  $^1\text{O}_2$ , optou-se por um tempo mais inicial e um final para a realização dos ensaios posteriores, sendo assim escolheu-se os tempos de 48 e 96 h para os experimentos seguintes.

## 7.2 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR

### 7.2.1 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS MELAN-A COM PMA 48 H APÓS O TRATAMENTO

O ensaio de morfologia foi realizado em apenas 48 h após a fotossensibilização devido a confluência celular muito alta nos tempos maiores, sendo inviável para a análise de morfologia.

Na FIGURA 10 são mostrados os resultados da avaliação da morfologia das células Melan-a com PMA após 48 h da fotossensibilização para geração do  $^1\text{O}_2$ . Não foram observadas alterações na morfologia dessas células em nenhum dos grupos experimentais.

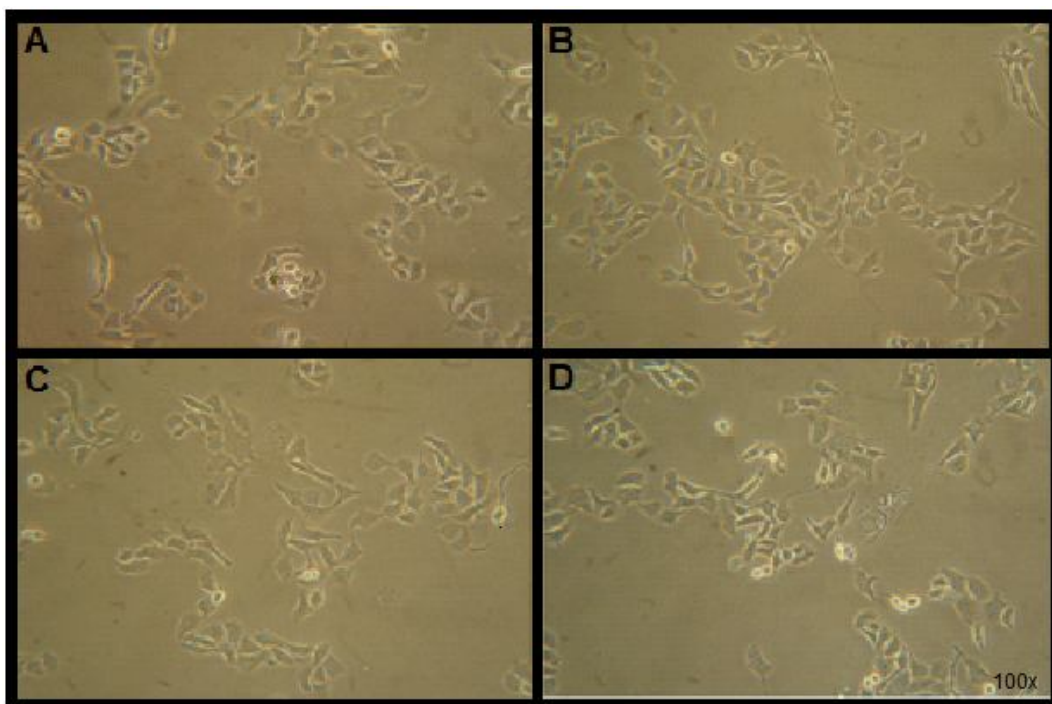


FIGURA 10 – MORFOLOGIA DAS CÉLULAS MELAN-A COM PMA APÓS 48 H DO TRATAMENTO COM  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: Autor (2011)

NOTA: Micrografias da morfologia das células Melan-a com PMA após 48 h da fotossensibilização do corante Rosa Bengala ( $0,5 \mu\text{mol/L}$ ) por 10 min a temperatura ambiente para geração do  $^1\text{O}_2$  (aumento de 100X). A – Células controle não irradiadas (PBS não irradiado). B – Células tratadas com  $0,5 \mu\text{mol/L}$  de RB sem irradiação. C – Células controle irradiadas (PBS irradiado). D – Células tratadas com  $0,5 \mu\text{mol/L}$  de RB e irradiadas. Irradiação conforme descrito no item 6.3

### 7.2.2 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16-F10 SEM PMA 48 H APÓS O TRATAMENTO

As células B16-F10 sem PMA foram plaqueadas, irradiadas para geração do  $^1\text{O}_2$  e após 48 h a morfologia celular foi avaliada por microscópio óptico e as micrografias foram capturadas com câmera Sony.

Na FIGURA 11 estão micrografias representativas das células B16-F10 sem PMA que é uma micrografia representativa desse grupo, sendo que as demais replicatas também apresentaram essas alterações. Observa-se que ocorreram discretas alterações na morfologia das células B16-F10 sem PMA RB irradiadas (células espreiadas, indicado pela seta), com uma menor quantidade de células (FIGURA 11D), acredita-se que essas alterações sejam devido ao  $^1\text{O}_2$  formado por fotossensibilização. De fato, já foi mostrado que células de cardiomiocitos tiveram alteração na morfologia e diminuição no número de células após a fotossensibilização do corante Rosa Bengala para geração do  $^1\text{O}_2$  (OLBRICH, 1996). Os demais grupos experimentais mostraram morfologia normal desse tipo celular.



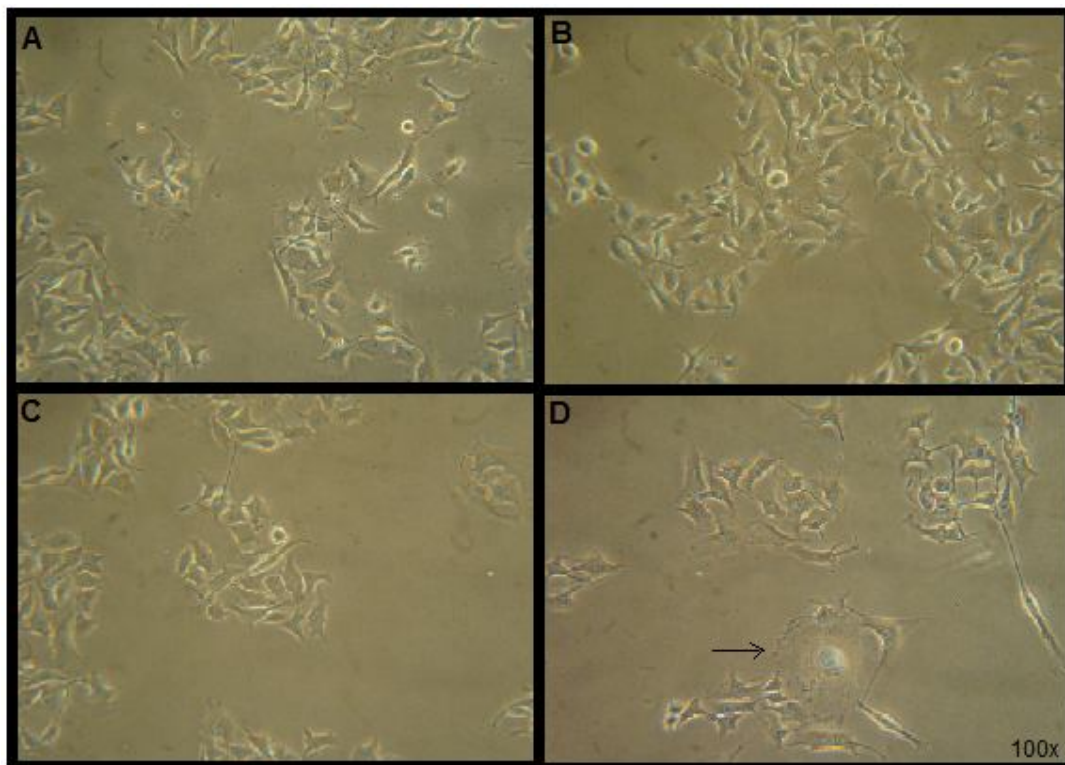


FIGURA 11 – MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16-F10 SEM PMA APÓS 48 H DO TRATAMENTO COM  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: Autor (2011)

NOTA: Micrografias da morfologia das células B16-F10 sem PMA após 48 h da fotossensibilização do corante Rosa Bengala ( $0,5 \mu\text{mol/L}$ ) por 10 min a temperatura ambiente para geração do  $^1\text{O}_2$  (aumento de 100X). A – Células controle não irradiadas (PBS não irradiado). B – Células tratadas com  $0,5 \mu\text{M/L}$  de RB sem irradiação. C – Células controle irradiadas (PBS irradiado). D – Células tratadas com  $0,5 \mu\text{M/L}$  de RB e irradiadas. Célula apresentando uma morfologia alterada (seta). Irradiação conforme descrito no item 6.3.

### 7.2.3 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16-F10 COM PMA 48 H APÓS O TRATAMENTO

As células B16-F10 com PMA foram plaqueadas, irradiadas para geração do  $^1\text{O}_2$  e após 48 h a morfologia celular foi avaliada por microscópio óptico e as micrografias foram capturadas com câmera Sony.

Observam-se discretas alterações na morfologia das células B16-F10 com PMA RB irradiadas, com uma diminuição na quantidade de células. Podemos observar a existência de células espaiadas (seta), demonstrado na FIGURA 12D, que é uma micrografia representativa desse grupo, sendo que as demais replicatas também apresentaram essas alterações. Essas alterações

mais uma vez podem ser atribuídas ao  $^1\text{O}_2$  formado. Os demais grupos experimentais mostraram morfologia normal desse tipo celular.

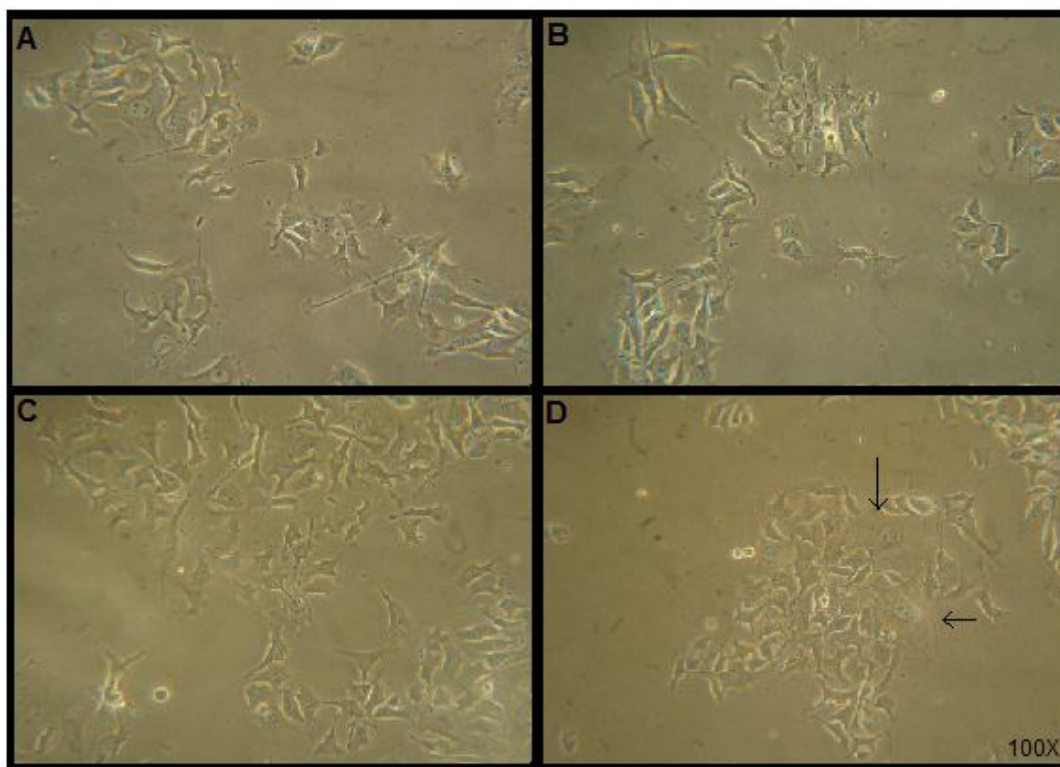


FIGURA 12 – MORFOLOGIA DAS CÉLULAS B16-F10 COM PMA APÓS 48 H DO TRATAMENTO COM  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: Autor (2011)

NOTA: Micrografias da morfologia das células B16-F10 com PMA após 48 h da fotossensibilização do corante Rosa Bengala (0,5 µmol/L) por 10 min a temperatura ambiente para geração do  $^1\text{O}_2$  (aumento de 100X). A – Células controle não irradiadas (PBS não irradiado). B – Células tratadas com 0,5 µM/L de RB sem irradiação. C – Células controle irradiadas (PBS irradiado). D – Células tratadas com 0,5 µM/L de RB e irradiadas. Células apresentando uma morfologia alterada (setas). Irradiação conforme descrito no item 6.3.

Esses resultados corroboram estudos anteriores do grupo de pesquisa de Oxidações Biológicas do Departamento de Ciências Bioquímica, onde foi mostrado que o  $^1\text{O}_2$  gerado por decomposição do endoperóxido (sem luz) leva a alterações na morfologia de células B16-F10, observado por análise de microscopia eletrônica de varredura (SANTOS, 2007).

No decorrer dos experimentos foi observada uma mudança na coloração do *pellet* celular, onde as células B16-F10 com PMA RB irradiadas após 96 h mostraram um possível aumento na produção de melanina como pode ser observado pela coloração escura do *pellet* celular (FIGURA 13).

Possivelmente, o aumento encontrado nas células seja devido à geração do  $^1\text{O}_2$ . De fato, foi mostrado que a radiação UV estimulou a melanogênese (síntese de melanina) de células de melanoma humano (S91) (FRIEDMANN, GILCHREST, 1987). Outro fator que pode influenciar é confluência celular, pois os resultados de Huberman, Heckman, Langenbach (1979) mostraram que células de melanoma humano (HO) quando atingem uma confluência muito alta (saturada de células na cultura) apresenta células com aumento na síntese de melanina. As células B16-F10 no tempo de 96 h se encontram em uma confluência alta, como mostra a FIGURA 14. Existe ainda o efeito do PMA na cultura dessas células que pode ter contribuído, pois foi mostrado também que o PMA poderia estimular a síntese de melanina em células de melanoma humano (HO) (HUBERMAN, HECKMAN, LANGENBACH, 1979).

Além disso, já foi mostrado nos estudos de Medrano *et al.*, (1994), que células senescentes tem como característica um aumento na deposição de melanina.

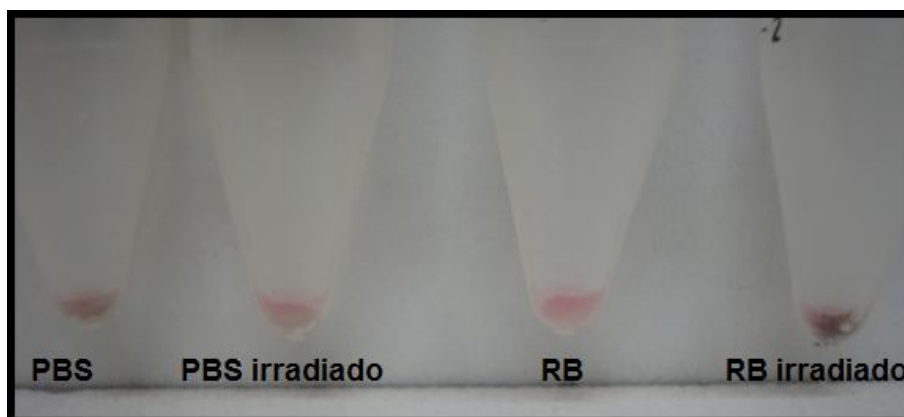


FIGURA 13 – FOTOGRAFIA DO PELLET DAS CÉLULAS B16-F10 COM PMA APÓS 96 H DO TRATAMENTO COM  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: Autor (2011)

NOTA: Fotografia representativa do pellet das células B16-F10 com PMA após 96 h da fotossensibilização com corante Rosa Bengala ( $0,5 \mu\text{mol/L}$ ) por 10 min a temperatura ambiente para geração do  $^1\text{O}_2$ . Irradiação conforme descrito no item 6.3.

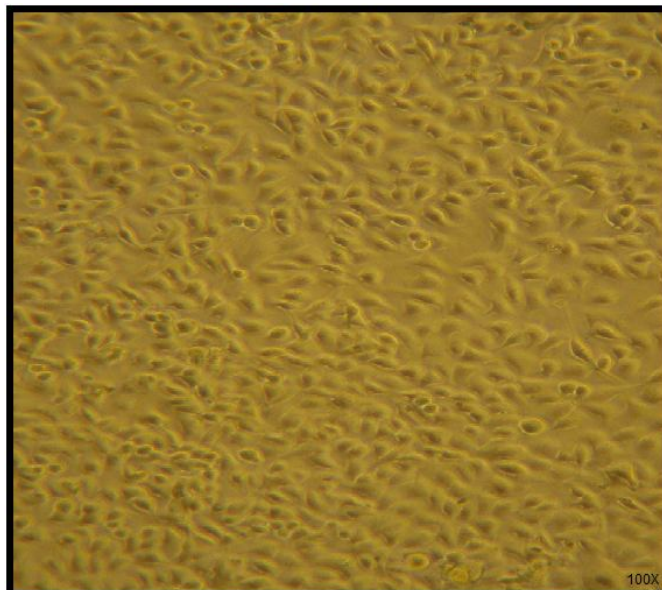


FIGURA 14 – MICROGRAFIA DAS CÉLULAS B16-F10 COM PMA APÓS 96 H DO TRATAMENTO COM  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: Autor (2011)

NOTA: Micrografia representativa das células B16-F10 com PMA após 96 h da fotossensibilização com corante Rosa Bengala ( $0,5 \mu\text{mol/L}$ ) por 10 min a temperatura ambiente para geração do  $^1\text{O}_2$  (aumento de 100X). Células B16-F10 com PMA RB irradiadas. Irradiação conforme descrito no item 6.3.

### 7.3 AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA CELULAR

#### 7.3.1 AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA DAS CÉLULAS MELAN-A COM E SEM PMA 48 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM OXIGÊNIO SINGLETE

Nesse experimento foi realizado o cultivo da linhagem Melan-a com e sem PMA, para ver possíveis alterações devido ao PMA, pois já foi mostrado que o PMA pode levar células a desenvolverem respostas senescentes (OLIVA *et al.*, 2008).

As células Melan-a com e sem PMA foram plaqueadas e fotossensibilizadas para geração do  $^1\text{O}_2$ . Após 48 e 96 h, a senescência celular foi avaliada pela atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal). O método da atividade da enzima  $\beta$ -Gal, encontrada nos lisossomos, baseia-se na formação, em pH 6,0, de um composto que produz coloração azul em células senescentes (DEBACQ-CHAINIAUX *et al.*, 2009). Esse fato pode ser explicado

por células senescentes apresentarem maior número de lisossomos e ainda a massa lisossomal aumentada, portanto as células senescentes apresentam maior atividade da enzima  $\beta$ -Gal (KURZ *et al.*, 2000). Esse ensaio é muito utilizado para avaliação da senescência celular (DIMRI *et al.*, 1995; STEIN *et al.*, 1999; TOUSSAINT, MEDRANO, ZGLINICKI, 2000; ELMORE *et al.*, 2002; POELE *et al.*, 2002; ROBERSON *et al.*, 2005; HA *et al.*, 2007; BUNT *et al.*, 2010). Dessa forma, foram quantificadas como células senescentes as coradas de azul e não senescentes as não coradas de azul.

Na FIGURA 15A e 15B são mostrados os resultados da avaliação da senescência das células Melan-a com e sem PMA, após 48 e 96 h, respectivamente, da fotossensibilização para geração do  $^1\text{O}_2$ . Os resultados estão expressos como porcentagem de células senescentes. Não foram observadas alterações da atividade da enzima  $\beta$ -Gal dessas células em nenhum dos grupos e tempos experimentais.

Reiners *et al.*, (2009) também não observaram aumento da atividade da enzima  $\beta$ -Gal em células Melan-a tratadas com um dos quimioterápicos, chamado XK469 (2-{4-[(7-Chloro-2-quinolinyloxy]phenoxy}propionic acid) de dois utilizados no trabalho (o outro composto foi SH80 (2-{4-[(7-Bromo-2-quinolinyloxy]phenoxy}propionic acid), após 5 dias do tratamento.

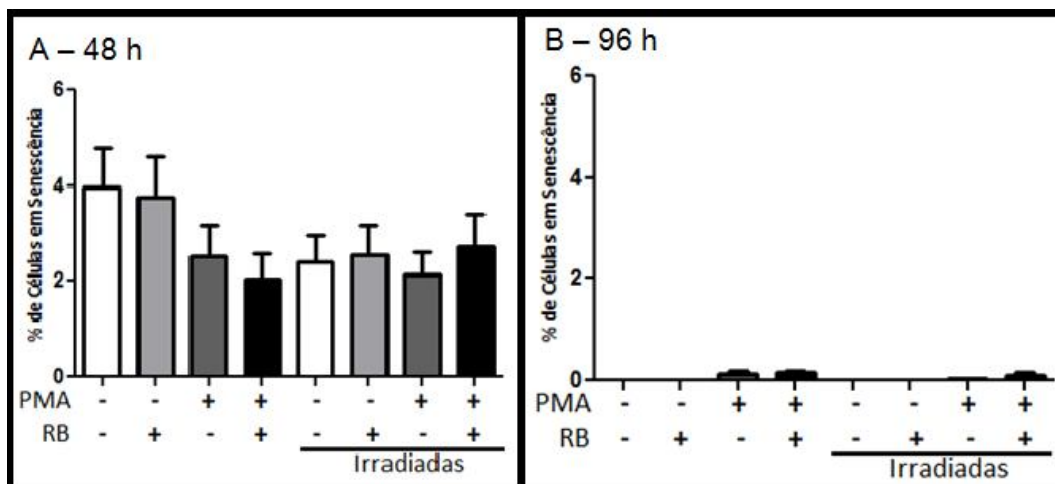


FIGURA 15 – SENESCÊNCIA DAS CÉLULAS MELAN-A COM E SEM PMA 48 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: Autor (2011)

NOTA: Gráficos da senescência das células Melan-a com e sem PMA após 48 (A) e 96 h (B) da fotossensibilização do corante Rosa Bengala (0,5  $\mu\text{mol/L}$ ) por 10 min a temperatura ambiente, para geração do  $^1\text{O}_2$ . A senescência celular foi analisada pela técnica da atividade da enzima  $\beta$ -Gal conforme item 6.6. O resultado é representado pela média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

### 7.3.2 AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA DAS CÉLULAS B16-F10 COM E SEM PMA 48 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM OXIGÊNIO SINGLETE

As células B16-F10, cultivadas nas condições com e sem PMA, foram plaqueadas e fotossensibilizadas para geração do  $^1\text{O}_2$ . Após 48 e 96 h a senescência celular foi avaliada pela atividade da enzima  $\beta$ -Gal.

Foi observado um aumento de 300% da atividade da enzima  $\beta$ -Gal das células B16-F10 sem PMA RB irradiadas após 48 h da irradiação quando comparadas ao controle PBS não irradiado (FIGURA 16A). Esse aumento pode ser explicado, possivelmente, pela geração do  $^1\text{O}_2$ , levando a um aumento da atividade da enzima. Já é provado que espécies reativas levam as células a desenvolverem respostas senescentes (PERCIVAL, DODGE, 1983; CHEN *et al.*, 1998; MACIP *et al.*, 2003; BURHANS, HEINTZ, 2009). Sendo que o aumento da atividade dessa enzima é utilizado em vários trabalhos para mostrar a eficácia de diferentes tratamentos em causar respostas senescentes em células (DIMRI *et al.*, 1995; HERRMANN *et al.*, 1998;



ELMORE *et al.*, 2002; POELE *et al.*, 2002; DMITRIEVA, BURG, 2007; HA *et al.*, 2007). Vários estudos mostram aumento da atividade da enzima  $\beta$ -Gal em células tumorigênicas senescentes (ELMORE *et al.*, 2002; POELE *et al.*, 2002; ROBERSON *et al.*, 2005), mais especificamente, já foi mostrado aumento da atividade dessa enzima em células de melanoma murino senescentes (HA *et al.*, 2007).

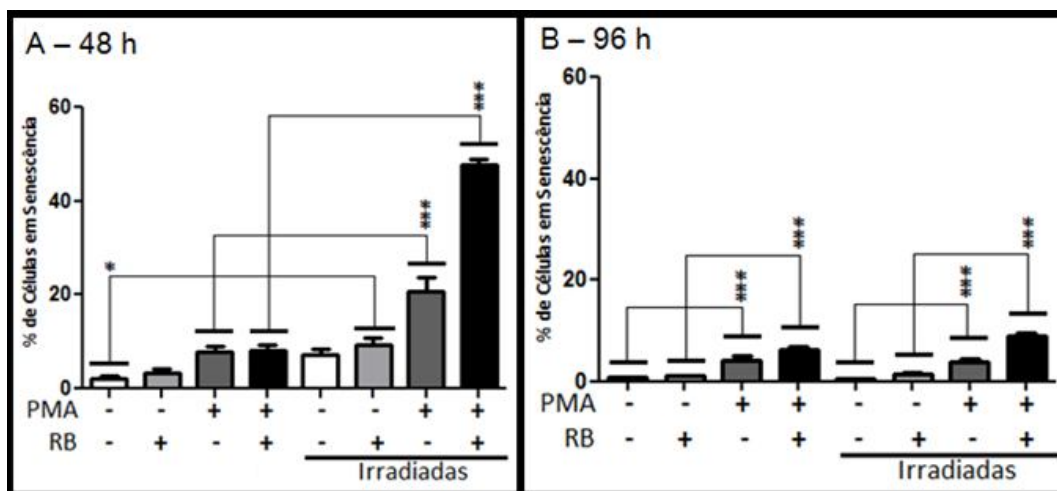


FIGURA 16 – SENESCÊNCIA DAS CÉLULAS B16-F10 COM E SEM PMA 48 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: Autor (2011)

NOTA: Gráficos da senescência das células B16-F10 com e sem PMA após 48 (A) e 96 h (B) da fotossensibilização do corante Rosa Bengala ( $0,5\mu\text{mol/L}$ ) por 10 minutos a temperatura ambiente, para geração do  $^1\text{O}_2$ . A senescência celular foi analisada pela técnica da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase conforme item 6.6. O resultado é representado pela média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. As significâncias estatísticas obtidas são referentes aos demais grupos no mesmo tempo experimental. One-Way ANOVA: Tukey. \*\*\* =  $p < 0.001$ , \* =  $p < 0.05$ .

Ocorreu um aumento de 150% da atividade da enzima  $\beta$ -Gal das células B16-F10 com PMA PBS irradiado após 48 h de irradiação com relação ao seu controle não irradiado (FIGURA 16A). Novamente, o aumento continua a ser em células irradiadas, porém nesse grupo não há geração de  $^1\text{O}_2$ , mas a presença do PMA no meio dessas células potencializou a ação da luz, gerando uma resposta senescente. Oliva *et al.*, (2008) observaram um aumento da atividade dessa enzima em células de câncer de pulmão cultivadas em meio enriquecido com PMA, mas nesse trabalho, a resposta foi obtida mesmo na ausência de luz.

Nas células B16-F10 com PMA RB irradiado ocorreu um aumento de 500% da atividade da enzima  $\beta$ -Gal após 48 h da irradiação, quando comparado ao seu controle não irradiado (FIGURA 16A). Novamente, o aumento ocorre em células irradiadas, mas também com geração de  $^1\text{O}_2$  e presença de PMA, esse aumento tão acentuado possivelmente seja um efeito acumulativo, do  $^1\text{O}_2$  (gerado por fotossensibilização) mais o PMA, visto que os grupos irradiados que tinham só a geração de  $^1\text{O}_2$  ou só a presença do PMA no meio de cultura já tiveram um aumento da atividade da enzima, e esse aumento foi mais acentuado nessas células que tinham concomitante irradiação com geração do  $^1\text{O}_2$  mais o PMA.

Nos estudos de Takahashi *et al.*, (2006) foi mostrado que ROS e PKC podem estar relacionadas com a senescência celular, os autores mostraram que as proteínas p16 e pRb cooperam para induzir elevados níveis de espécies reativas de oxigênio, ativando assim a PKC em células de fibroblastos humanos senescentes. Uma vez ativada por ROS, a PKC promove nova geração de ROS, estabelecendo assim uma retroalimentação positiva para sustentar a sinalização ROS/PKC.

Assim, nossos resultados sugerem um aumento de senescência em células B16-F10 com PMA RB irradiadas, pois estas têm aumento de  $^1\text{O}_2$ , uma espécie reativa que já foi mostrada por causar senescência em células de vegetal (PERCIVAL, DODGE, 1983) e ainda, no mesmo grupo, há um aumento da atividade da PKC devido ao PMA, que já foi mostrado estar relacionada com respostas senescentes (WHEATON, RIABOWOL, 2004; TAKAHASHI *et al.*, 2006).

Em particular, o envolvimento da PKC na senescência celular foi descrito por Wheaton, Riabowol (2004) onde a atividade da PKC foi aumentada em células em senescência replicativa. Vijayan *et al.*, (2004) mostraram que o PMA é capaz de mudar a distribuição relativa da PKC entre a membrana, o citosol e o núcleo, assim o PMA pode alterar a atividade dessa proteína nas células.

Por sua vez, após 96 h do tratamento observa-se um aumento da atividade da enzima  $\beta$ -Gal em grupos não irradiados, mas que eram cultivadas em PMA. Assim, as células B16-F10 com PMA PBS e RB não irradiadas apresentaram aumento de 300% e 400%, respectivamente, da atividade da



enzima  $\beta$ -Gal, com relação aos grupos PBS e RB sem PMA não irradiados em 96 h (FIGURA 16B), porém quando comparamos com os seus controles não irradiados esse aumento não ocorre, sugerimos, então, que esse aumento continua sendo possivelmente pela presença do PMA nas células, porém um efeito menos acentuado do que nas células irradiadas, mostrando que a irradiação, e não só o PMA, exerce um papel sobre a atividade da enzima  $\beta$ -Gal. Todavia, se considerarmos a porcentagem absoluta de células senescentes de 48 (6%) para 96 (3,2%) h, podemos observar que se trata de uma quantidade que permaneceu quase inalterada de 48 para 96 h colocar os valores.

Ainda, observa-se um aumento da atividade da enzima  $\beta$ -Gal nas células B16-F10 com PMA PBS e RB irradiadas, sendo 350% e 450%, respectivamente, quando comparado aos grupos PBS e RB sem PMA irradiados no tempo de 96 h (FIGURA 16B). Entretanto, quando comparado ao seu controle não irradiado não se observa diferença estatística. Mostrando que a luz e/ou o  $^1\text{O}_2$  não induziu uma alteração permanente na célula que mantivesse a atividade da  $\beta$ -Gal elevada, como observado em 48 h.

Foi mostrado nos estudos de Beauséjour *et al.*, (2003), que a senescência não se trata de um mecanismo obrigatoriamente irreversível, mas que quando mediado apenas pela proteína p53, é um mecanismo reversível. Assim podemos sugerir, que ocorre um mecanismo de reversão da senescência (diminuição da atividade da enzima  $\beta$ -Gal) nas células de 96 h quando comparadas com as de 48 h.

Em 96 h, o grupo B16-F10 sem PMA RB irradiado não apresenta aumento na atividade da enzima  $\beta$ -Gal em relação ao respectivo controle não irradiado, como ocorreu no tempo de 48 h, coerente com uma diminuição da viabilidade em 96 h nesse mesmo grupo. Acredita-se que as células tenham inicialmente uma alteração da atividade da  $\beta$ -Gal que posteriormente poderiam estar entrando em processo de apoptose, visto que mecanismos que levam a senescência também desencadeiam apoptose (COLLADO, BLASCO, SERRANO, 2007).

Dimri *et al.*, (1995) concluem que a atividade da enzima  $\beta$ -Gal não é um marcador universal de senescência replicativa, visto em seus estudos que

algumas células, como fibroblastos mesmo quando senescentes não apresentaram atividade da enzima aumentada. Os autores sugerem que  $\beta$ -Gal deve ter funções específicas na célula e a alteração da sua atividade pode ser limitado a certos tipos de células. No entanto,  $\beta$ -Gal foi um bom marcador de senescência em algumas células humanas. Além disso, sua indução pode depender da idade replicativa ou fisiológica, sugerindo que ela poderia servir como um biomarcador de envelhecimento.

## 7.4 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

### 7.4.1 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS MELAN-A COM PMA 48 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM OXIGÊNIO SINGLETE

Com base nos dados obtidos após os experimentos de senescência celular, foi decidido avaliar os efeitos do tratamento com  $^1\text{O}_2$  nas linhagens estudadas sobre a progressão das diferentes fases do ciclo celular.

As células Melan-a com PMA foram plaqueadas, irradiadas para geração do  $^1\text{O}_2$  e após 48 e 96 h foi realizado ensaio de ciclo celular, através de Citometria de Fluxo. Atualmente, a maioria das análises de verificação das fases do ciclo celular é feito por citometria de fluxo, com base no histograma do DNA que detecta a distribuição do ciclo celular (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1992), conforme FIGURA 17, onde A representa a área de células que estão em SubG1 (DNA fragmentado), B células que estão na fase G1 do ciclo celular e C células que estão na fase G2/M do ciclo celular.

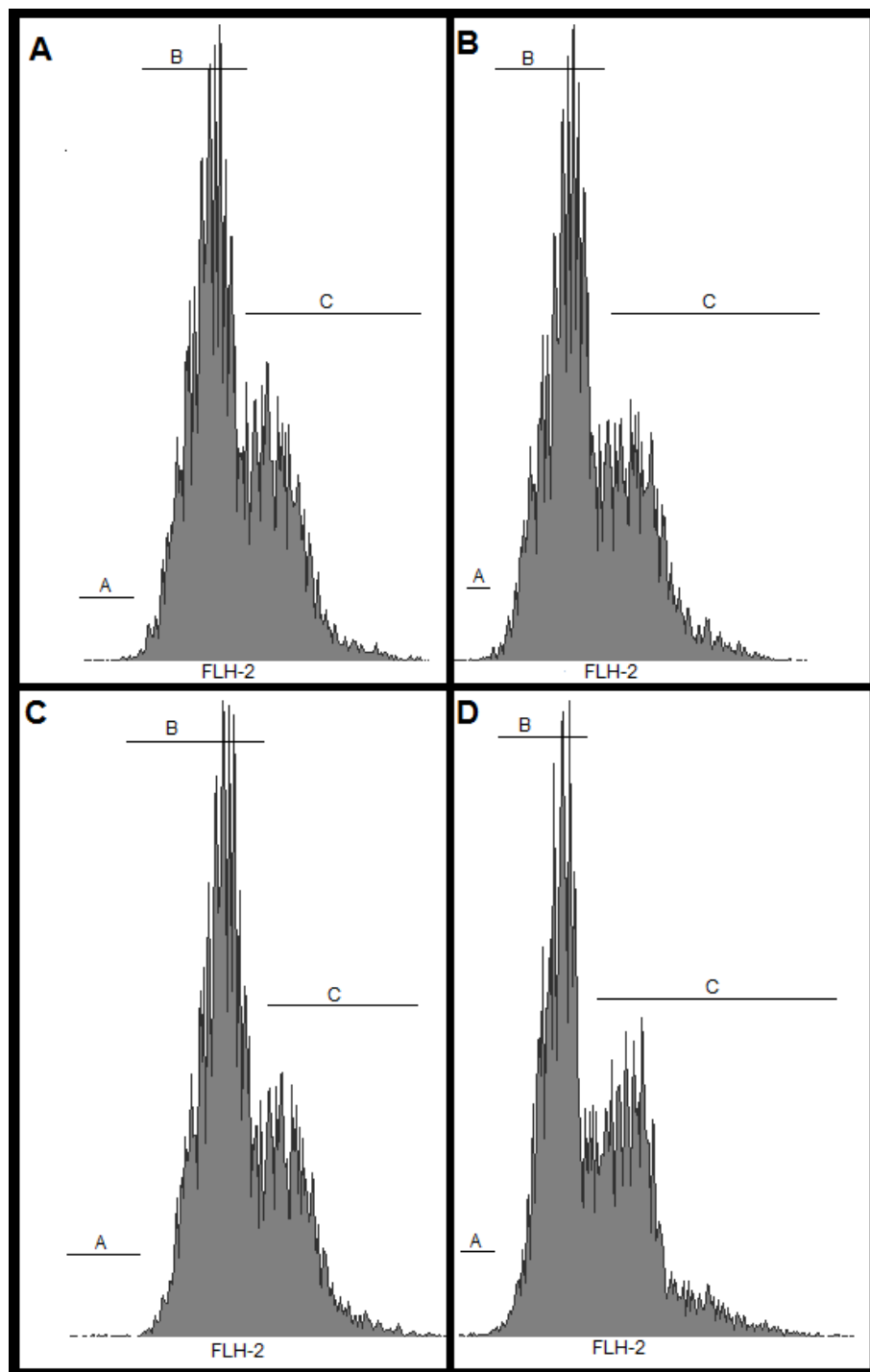


FIGURA 17 – DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS MELAN-A COM PMA ATRAVÉS DAS FASES DO CICLO CELULAR (REPRESENTAÇÃO POR HISTOGRAMA)

FONTE: Autor (2011)

NOTA: Células Melan-a com PMA. A – Células controle não irradiadas (PBS não irradiado). B – Células tratadas com 0,5  $\mu\text{mol/L}$  de RB sem irradiação. C – Células controle irradiadas (PBS irradiado). D – Células tratadas com 0,5  $\mu\text{mol/L}$  de RB e irradiadas. Histogramas obtidos em citômetro de fluxo, conforme item 6.7.

Na FIGURA 18 são mostrados os resultados da avaliação do ciclo celular das células Melan-a com PMA, após 48 (A) e 96 h (B) da fotossensibilização para geração do  $^1\text{O}_2$ . Os resultados estão expressos como porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. Não foram observadas alterações do ciclo celular dessas células em nenhum dos grupos experimentais nos diferentes tempos.

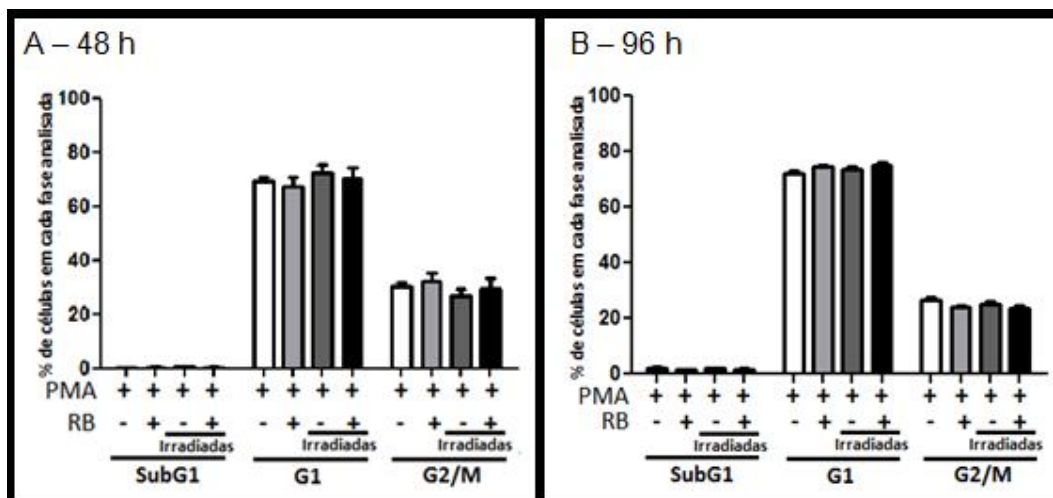


FIGURA 18 – CICLO CELULAR DAS CÉLULAS MELAN-A COM PMA 48 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: Autor (2011)

NOTA: Análise do ciclo celular das células Melan-a com PMA após 48 (A) e 96 h (B) da fotossensibilização do corante Rosa Bengala (0,5  $\mu\text{mol/L}$ ) por 10 minutos a temperatura ambiente para geração do  $^1\text{O}_2$ . O ciclo celular foi analisado por Citometria de Fluxo conforme item 6.7. O resultado é representado pela média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

#### 7.4.2 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS B16-F10 COM E SEM PMA 48 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM OXIGÊNIO SINGLETE

As células B16-F10, cultivadas com e sem adição de PMA, foram plaqueadas e fotossensibilizadas para geração do  $^1\text{O}_2$ , após 48 e 96 h foi realizado ensaio de ciclo celular, através de Citometria de Fluxo, conforme FIGURA 19 para células B16-F10 sem PMA e FIGURA 20 para células B16-F10 com PMA, onde A representa a área de células que estão em SubG1 (DNA fragmentado), B células que estão na fase G1 do ciclo celular e C células que estão na fase G2/M do ciclo celular

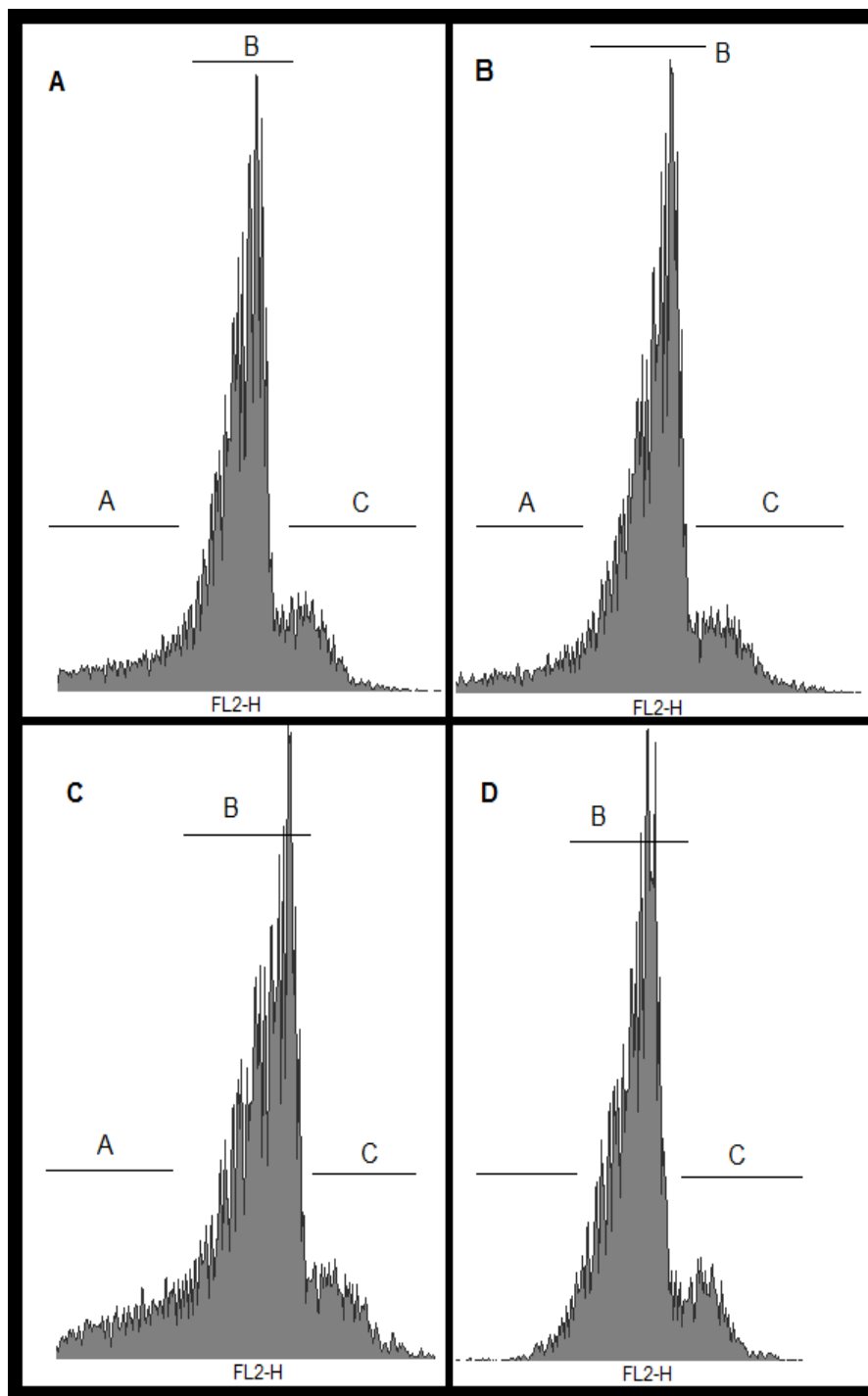
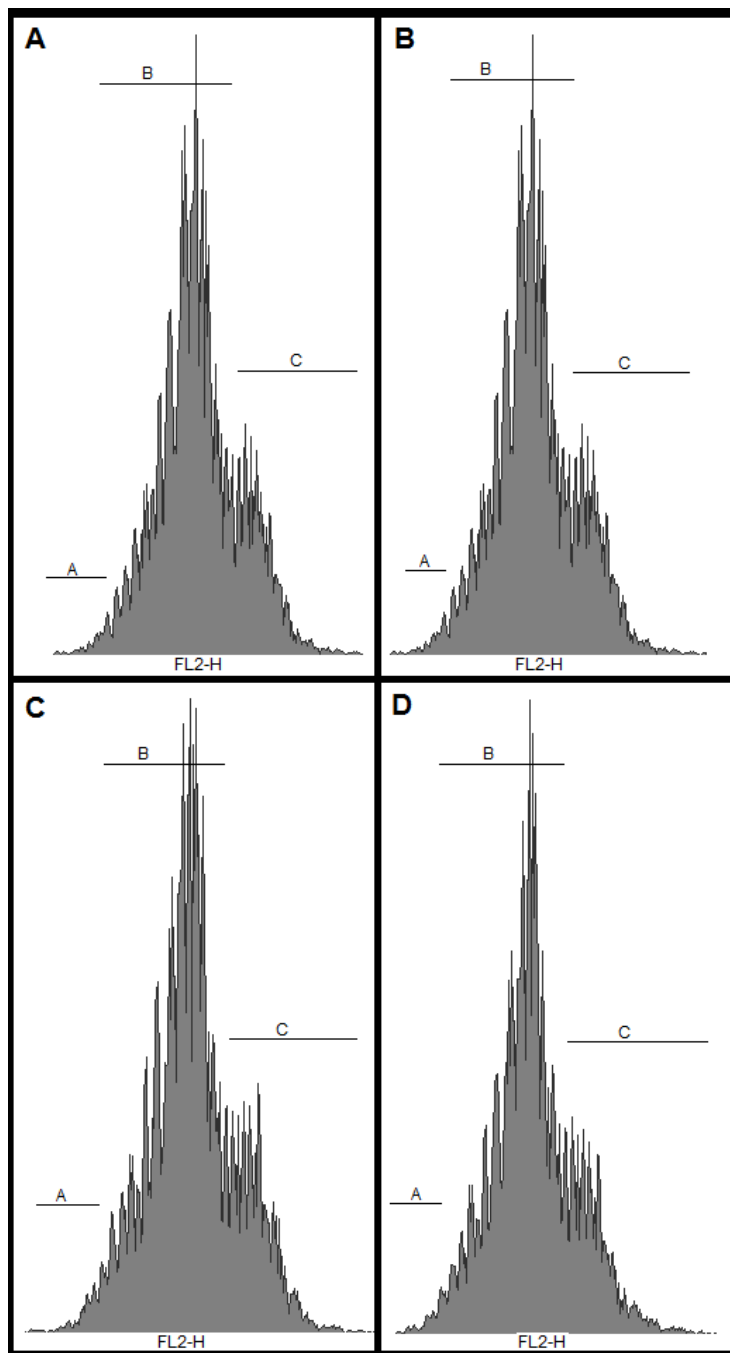


FIGURA 19 – DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS B16-F10 SEM PMA ATRAVÉS DAS FASES DO CICLO CELULAR (REPRESENTAÇÃO POR HISTOGRAMA)

FONTE: Autor (2011)

NOTA: Células B16-F10 sem PMA. A – Células controle não irradiadas (PBS não irradiado). B – Células tratadas com 0,5  $\mu\text{mol/L}$  de RB sem irradiação. C – Células controle irradiadas (PBS irradiado). D – Células tratadas com 0,5  $\mu\text{mol/L}$  de RB e irradiadas. Histogramas obtidos em citômetro de fluxo, conforme item 6.7.



**FIGURA 20 – DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS B16-F10 COM PMA ATRAVÉS DAS FASES DO CICLO CELULAR (REPRESENTAÇÃO POR HISTOGRAMA)**

**FONTE:** Autor (2011)

**NOTA:** Células B16-F10 com PMA. A – Células controle não irradiadas (PBS não irradiado). B – Células tratadas com 0,5  $\mu\text{mol/L}$  de RB sem irradiação. C – Células controle irradiadas (PBS irradiado). D – Células tratadas com 0,5  $\mu\text{mol/L}$  de RB e irradiadas. Histogramas obtidos em citômetro de fluxo, conforme item 6.7.

Na FIGURA 21 são mostrados os resultados da avaliação do ciclo celular das células B16-F10 com e sem PMA, após 48 e 96 h da fotossensibilização para geração do  $^1\text{O}_2$ . Os resultados estão expressos como porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. Não foram observadas alterações do ciclo celular dessas células em nenhum dos grupos experimentais nos diferentes tempos.

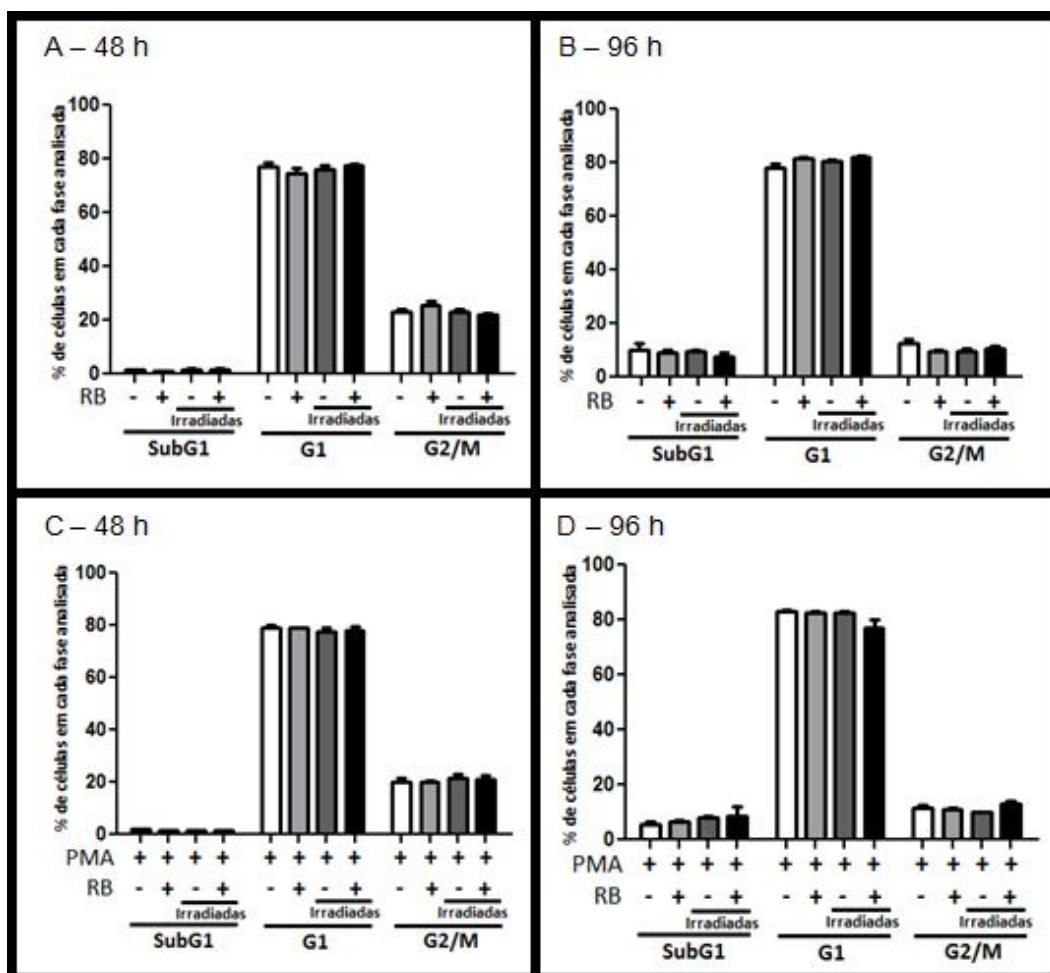


FIGURA 21 – CICLO CELULAR DAS CÉLULAS B16-F10 COM E SEM PMA 48 E 96 H APÓS O TRATAMENTO COM  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: Autor (2011)

NOTA: Análise do ciclo celular das células B16-F10 com PMA após 48 (A) e 96 h (B) e sem PMA após 48 (C) e 96 h (D) da fotossensibilização do corante Rosa Bengala ( $0,5\mu\text{mol/L}$ ) por 10 minutos a temperatura ambiente, para geração do  $^1\text{O}_2$ . O ciclo celular foi analisado por Citometria de Fluxo conforme item 6.7. O resultado é representado pela média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Observa-se uma discreta alteração na distribuição do histograma das fases do ciclo celular quando comparada as células B16-F10 com e sem PMA, podemos sugerir que essas alterações possam ser devido a presença do PMA no meio de cultura.

Xie *et al.*, (2005) também não detectaram alterações nas fases G0/G1 do ciclo celular de células de leucemia humana após irradiadas com luz UV por 0-4 h. Foi proposto pela primeira vez, em 2004, por Takahashi, Ogra, Suzuki, que as ROS são gerados em sincronia com o ciclo celular normal e que são controladas a nível certo para a progressão normal do ciclo celular, resultados estes observados em células de fibroblastos. Venkatachalam *et al.*, (2008) também mostraram em seus estudos que uma quantidade de ROS é importante na regulação da progressão normal do ciclo celular. Assim podemos sugerir que a espécie reativa gerada (oxigênio singlete) não interferiu na progressão normal do ciclo celular.

Essa hipótese está em harmonia com numerosas observações que apoiam a visão de que ROS podem servir como moléculas de sinalização da proliferação, diferenciação e morte celular (SAUER, WARTENBERG, HESCHELER, 2001). Por outro lado, ROS também podem agir como subprodutos tóxicos, do metabolismo, inibindo assim a divisão celular. Este duplo papel de ROS depende, sobretudo, da concentração formada e do local de ação (FERHÉR, *et al.*, 2008).



## 8. DISCUSSÃO

Existe a hipótese de que as ROS estejam envolvidas com o processo de envelhecimento através de danos moleculares. Embora, ainda existam resultados conflitantes dos estudos *in vivo*, o impacto dos níveis de ROS na senescência *in vitro* tem sido bem documentado (MULLER *et al.*, 2007).

Células normais após um número limitado de divisões entram em senescência, no entanto, células tumorigênicas não entram nesse estado de parada e proliferam por tempo indeterminado. Assim, o processo de senescência celular é colocado como um mecanismo de supressão tumoral (COLLADO, BLASCO, SERRANO, 2007), pois células que entram em um estado de senescência cessam sua divisão celular e param de proliferar. As investigações a cerca deste assunto poderiam também contribuir para esclarecer se as terapias que induzem a senescência seriam úteis no tratamento de câncer.

Deste modo, o modelo de estudo foi escolhido devido à ineficácia das abordagens terapêuticas usuais no tratamento do melanoma e devido sua alta letalidade. A utilização da linhagem murina (B16-F10) se deve ao fato da disponibilidade de melanócitos murinos imortalizados (Melan-a) que podem ser usados para um comparativo dos efeitos do tratamento em ambas as linhagens.

O  $^1\text{O}_2$  foi gerado por fotossensibilização do corante Rosa Bengala. A terapia por fotossensibilização é muito utilizada no tratamento de diferentes tipos tumorais, porém ainda não se mostrou eficaz na terapia do melanoma (MA *et al.*, 2007).

A utilização da fotossensibilização do corante Rosa Bengala para geração do  $^1\text{O}_2$  já é bem documentada. Estudos anteriores realizados pelo estudante Paulo Roberto Worfel de nosso laboratório no desenvolvimento dos trabalhos de seu doutorado possibilitaram a adaptação do método utilizado por Kochevar e Redmond (2000). Foi determinado o tempo de irradiação das células para geração do  $^1\text{O}_2$  suficiente para diminuir a viabilidade celular em pequena escala, para permitir a investigação se as células que não morrem

poderiam disparar o processo de senescência. Assim, foi determinado como ótimo o tempo de 10 minutos de exposição e a concentração 0,5  $\mu\text{mol/L}$  de Rosa Bengala. Para a fotossensibilização pode ser utilizado laser ou lâmpada, em nosso trabalho escolhemos a utilização de lâmpadas de mercúrio devido a sua disponibilidade e custo. Foi usado um filtro acrílico com corte em 550 nm específico para o comprimento de onda de geração do  $^1\text{O}_2$ .

As células Melan-a são comumente cultivadas na presença de um estimulador da proliferação, o PMA, e as células B16-F10 não, assim, para podermos comparar os resultados das linhagens B16-F10 com os da Melan-a realizamos os ensaios da B16-F10 também em presença de PMA e a Melan-a também na ausência do PMA. Porém, as células Melan-a sem PMA não tiveram um crescimento satisfatório para a realização dos experimentos de contagem com Azul de Trypan, portanto a linhagem Melan-a foi testada apenas na presença de PMA.

Lebedeva *et al.*, (2007) mostraram que o  $^1\text{O}_2$  causava maior diminuição na viabilidade de células de câncer de próstata quando comparado com células normais, sugerindo que ocorreu uma seletividade para as células tumorigênicas, com uma maior toxicidade para as neoplásicas quando avaliadas pelo método do MTT. Também foi mostrado por Marchesi (2008) que o óxido nítrico diminuiu a viabilidade de células de melanoma (B16-F10) mas não as células de melanócitos normais (Melan-a), quando avaliadas pelo método do MTT, mostrando mais uma vez a seletividade de uma espécie reativa frente às células de linhagens tumorais. O mesmo autor ainda mostrou que o  $^1\text{O}_2$  também levava a uma diminuição de células de melanoma (35%), porém uma diminuição menor quando comparado ao óxido nítrico, que o autor atribui ao baixo rendimento quântico do  $^1\text{O}_2$  na fotossensibilização utilizada em seu trabalho.

Nossos resultados de viabilidade celular estão de acordo com esses autores, pois foi observada uma diminuição de 6,1% na viabilidade das células B16-F10 sem PMA RB irradiadas em 96 h, essa diminuição possivelmente esteja relacionada com a formação de  $^1\text{O}_2$ . Essa diferença na diminuição da viabilidade pode ser atribuída às diferenças na geração do  $^1\text{O}_2$  e ao método de avaliação da viabilidade. Podemos sugerir que essa diminuição de viabilidade

só ocorra em 96 h, devido um efeito mais tardio do  $^1\text{O}_2$  (FIGURA 9). Nas células Melan-a não foram observadas diminuições na viabilidade em nenhum dos grupos experimentais nos diferentes tempos (FIGURA 8). Apesar das diferenças na geração da espécie reativa, e do tipo celular, nossos resultados corroboram com os da literatura supracitada, podemos sugerir então, uma possível seletividade do  $^1\text{O}_2$  gerado por fotossensibilização para as células de melanoma B16-F10 quando comparada com as células de melanócitos normais, Melan-a no tempo de 96 h.

As análises de viabilidade celular também mostraram que ocorreram pequenas diminuições da viabilidade em células B16-F10 com PMA PBS e RB não irradiados (8,4%) que persistem até o tempo de 48 h (6,1%) (FIGURA 9). Sugerimos que essa diminuição pode estar relacionada com o PMA no meio de cultura, sendo uma possível resposta da linhagem a esse estimulador da proliferação, visto que as células B16-F10 não são cultivadas na presença do mesmo. Já foi demonstrado que o PMA pode levar a uma inibição do crescimento de células de melanoma humano (HUBERMAN, HECKMAN, LANGENBACH, 1979).

Santos (2007) verificaram mudanças morfológicas causadas pela exposição de  $^1\text{O}_2$  gerado por termólise de endoperoxídeo em células de melanoma (B16-F10). Concordando com os resultados desse autor, mostramos que o  $^1\text{O}_2$  gerado por fotossensibilização alterou a morfologia de células B16-F10 com e sem PMA após 48 h da fotossensibilização, onde as células tiveram pequenas alterações na morfologia (FIGURAS 11 e 12). Essas mudanças persistem até o tempo de 96 h, porém as células atingem uma confluência muito alta, tornando-se visivelmente ruins para análise (dados não mostrados).

Durante os experimentos foi observado que as células B16-F10 com PMA RB irradiadas tinham a formação de um *pellet* celular com coloração mais escura em 96 h (FIGURA 14), possivelmente esteja ocorrendo um aumento da melanogênese dessas células devido ao  $^1\text{O}_2$  formado. Vários autores discutem o aumento da síntese de melanina em células, que podem ser atribuídas à luz UV (FRIEDMANN, GILCHREST, 1987), ao PMA, ou ainda, à confluência celular muito alta (HUBERMAN, HECKMAN, LANGENBACH, 1979).

Analisando os resultados da atividade da enzima  $\beta$ -Gal em 96 h nas mesmas células que tiveram a diminuição da viabilidade, observa-se que as células B16-F10 sem PMA RB irradiadas quando comparados aos grupos com PMA RB irradiado, tiveram aumento da senescência celular em 48 h (300%). Essas alterações não são observadas em 96 h. Isso poderia estar relacionada com a diminuição da viabilidade celular em 96 h, nesse mesmo grupo, por processos de morte celular. Sugerimos que essa morte celular pode possivelmente ser associada à apoptose, uma vez que os mecanismos que desencadeiam respostas apoptóticas também desencadeiam senescência celular (COLLADO, BLASCO, SERRANO, 2007).

Os outros resultados obtidos nos experimentos com a enzima  $\beta$ -Gal mostraram que as células B16-F10 com PMA PBS e RB irradiadas quando comparado com seus controles não irradiados (PBS e RB não irradiados) em 48 h tiveram um aumento de 150 e 500%, respectivamente, na atividade da enzima (FIGURA 16). Essas alterações não ocorrem em 96 h.

Porém, estudos mostraram que PKC (ativada pelo PMA) e as ROS podem estar relacionadas com respostas senescentes (WHEATON, RIABOWOL, 2004; TAKAHASHI *et al.*, 2006), o que poderia explicar esse aumento da atividade da enzima em 48 h.

Ainda, nas análises de  $\beta$ -Gal ocorreu um aumento de senescência em células B16-F10 com PMA PBS (300%) e RB (400%) não irradiadas (FIGURA 16), podemos associar esse aumento da senescência em 96 h com a diminuição da viabilidade celular que ocorreu até 48 h nesse mesmo grupo experimental, podemos sugerir então, que inicialmente as células tiveram uma resposta ao PMA, diminuindo um pouco a viabilidade, e depois recuperam a viabilidade e então entraram em senescência celular. Porém, se considerarmos as porcentagens absolutas de células em senescência quando comparados com as células em 48 h nesses mesmos grupos, podemos observar que essa alteração (aumento da enzima) não muda com relação a 96 h.

Com objetivo de obter outras evidências de senescência, além do aumento da atividade da enzima  $\beta$ -Gal, foram realizados ensaios de citometria de fluxo para análise do ciclo celular e ensaios de PCR em tempo real (RTq-

PCR) para análise da modulação da expressão gênica de marcadores associados ao processo senescente (p16, p19, p21, p27 e p53).

Não foram observadas diferenças estatísticas com relação às fases do ciclo celular em nenhuma das células e em nenhum dos diferentes tratamentos, apesar da literatura mostrar que células senescentes têm um aumento na fase G1 do ciclo celular (STEIN *et al.*, 1999). Os resultados dos experimentos em RTq-PCR (dados não mostrados) tiveram grande variação entre os experimentos, porém, observou-se que os valores de expressão após os tratamentos sempre estavam inferiores aos controles, não sugerindo o aumento de expressão esperado desses genes numa situação de senescência celular (HOLLSTEIN *et al.*, 1991; LIN *et al.*, 1998; FAGAGNA *et al.*, 2003).

Dessa forma, apesar do aumento da atividade de  $\beta$ -Gal em alguns grupos, a análise do ciclo não confirmou a parada de proliferação esperada para células senescentes.

Assim, mais estudos moleculares devem ser realizados para saber qual é o real papel do  $^1\text{O}_2$  gerado por fotossensibilização na participação da resposta senescente. Porém, nossos resultados apontam para uma seletividade do  $^1\text{O}_2$  para células de melanoma e que a presença do PMA na cultura das células de melanoma podem afetar a resposta ao  $^1\text{O}_2$  e ainda induzir uma reposta de morte celular e aumento da atividade da  $\beta$ -Gal.

## 9. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos nos experimentos realizados com células B16-F10 com e sem PMA e Melan-a com PMA fotossensibilizadas para a geração do  $^1\text{O}_2$ , concluímos:

- Ocorreu uma diminuição da viabilidade de células B16-F10 (PMA) PBS controle em 24 e 48h (24 h= 8,4% e 48 h= 3,1%);
- Ocorreu uma diminuição da viabilidade de células B16-F10 RB irradiadas em 96h (6,1%);
- Ocorreu um aumento da atividade da  $\beta$ -Gal em células B16-F10 RB irradiada em 48 h (300%);
- Ocorreu um aumento da atividade da  $\beta$ -Gal em células B16-F10 (PMA) PBS e RB irradiadas em 48 h, quando comparadas com seus controles não irradiados (PBS irradiada= 150% e RB irradiada= 500%). Essas alterações não são observadas em 96 h;
- Ocorreu um aumento da atividade da  $\beta$ -Gal em células B16-F10 (PMA) não irradiadas no tempo de 96h (PBS não irradiada= 300% e RB irradiada= 400%);
- Ocorreu aumento de pigmentação nas células B16-F10 com PMA RB irradiadas;
- Células Melan-a (com e sem PMA) não tiveram alterações na atividade da  $\beta$ -Gal e viabilidade celular (com PMA);
- Não ocorreram alterações nas fases do ciclo celular em nenhuma das linhagens.

Apesar do aumento da atividade da  $\beta$ -Gal em alguns grupos experimentais, a análise do ciclo não confirmou a parada de proliferação esperada para células em senescência celular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, A. L. *et al.* Clinical effects of photodynamic therapy on recurrent laryngeal papillomas. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 118, n. 1, p. 25-9, 1992.

AGNEZ-LIMA, L. F. *et al.* DNA repair and sequence context affect  $^1\text{O}_2$ - induced mutagenesis in bacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2899-2903, 2001.

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, ed. 4, 2006.

ALI, D.; RAY, R. S.; HANS, R. K. UVA-induced cytotoxicity and DNA damaging potential of benz (e) acephenanthrylene. **Toxicology Letters**, v. 199, p. 193-200, 2010.

ALLEN, M. T. *et al.* A wavelength dependent mechanism for rose bengal-sensitized photoinhibition of red cell acetylcholinesterase. **Biochim. Biophys. Acta**. V. 1075, n. 1, p. 42-49, 1991.

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de textos, 2006.

AVELINE, B. M.; HASAN, T.; REDMOND, R. W. The effects of aggregation, protein binding and cellular incorporation on the photophysical properties of benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPDMA). **J. Photochem. Photobiol.**, v. 30, p. 161-9, 1995.

BANUETT, F. Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 2, p.249-274, 1998.

BEAUSÉJOUR, M. C. *et al.* Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. **EMBO Journal**, v. 22, n. 16, p. 4212-4222, 2003.

BENJAMIN, C. L.; ANANTHASWAMY, H. N. P53 and the pathogenesis of skin cancer. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 224, p. 241-248, 2007.

BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.**, v.47, p.233-261, 1996.

BLOZNELYTE-PLESNIENE, L.; RUTKOVSKIENE, L. Photodynamic therapy of malignant and benign tumours in Lithuania. **Acta Medica Lituanica**, v. 14, n. 3, p. 193-200, 2007.

BOGENRIEDER, T.; HERLYN, M. Cell-surface proteolysis, growth factor activation and intercellular communication in the progression of melanoma. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 44, n. 1, p. 1-15, 2002.

BONDY, S. C. The relation of oxidative stress and hyperexcitation to neurological disease. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 208, n. 4, p. 337-345, 1995.

BORRIELLO, A. *et al.* P7Kip1 metabolism: a fascinating labyrinth. **Cell Cycle**, v. 6, p. 1053-1061, 2007.

BREYER, M. D.; ANDO Y. Hormonal signalling and regulation of salt and water transport in the collecting duct. **Ann. Rev. Physiol.** v. 56, p. 711-739, 1994.

BUNT, J. *et al.* Regulation of Cell Cycle Genes and Induction of Senescence by Overexpression of OTX2 in Medulloblastoma Cell Lines. **Mol. Cancer Res.**, v. 8, n. 10, p. 1344-1357, 2010.

BURGUETE, M. I. *et al.* Singlet oxygen generation using a porous monolithic polymer supported photosensitizer: potential application to the photodynamic destruction of melanoma cells. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 8, p. 37-44, 2009.

BURHANS, W. C.; HEINTZ, N. H. The cell cycle is a redox cycle: Linking phase-specific targets to cell fate. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 1282-1293, 2009.

CADET, J.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; RAVANAT, J. Oxidative damage to DNA: formation, mensurement and biochemical features. **Mutation Research**, v. 531, p. 5-23, 2003.



CAMPISI, J. Cancer, aging and cellular senescence. **In Vivo**, v. 14, n. 1, p. 183-188, 2000.

CAMPISI, J. Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. **Experimental Gerontology**, v. 38, p. 5-11, 2003.

CAMPISI, J. FAGAGNA, F. A. di. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 729-740, 2007.

CARRETERO, J. *et al.* Growth-associated changes in glutathione content correlated with liver metastatic activity of B16 melanoma cells. **Clin. Exp. Metastasis**, v.17, p. 567-574, 1999.

CHEN, Q. M. *et al.* Molecular analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. **Biochem. J.**, v. 332, p. 43-50, 1998.

CHEN, Q. M. *et al.* Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 4337-4341, 1995.

COCHRANE, C. G. Mechanisms of oxidant injury of cells. **Mol. Aspects Med.**, v. 12, n. 2, p. 137-147, 1991.

COLLADO, M.; BLASCO, M. A.; SERRANO, M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. **J. Cell**, v. 130, p. 223-233, 2007.

COLLADO, M.; SERRANO, M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, p. 472-476, 2006.

COLAVITTI, R.; FINKEL, T. Reactive Oxygen Species as Mediators of Cellular Senescence. **IUBMB Life**, v. 57, p. 277-281, 2005.

COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. **FASEB J.**, v. 17, p. 1195-1214, 2003.

COPPES, R. P. *et al.* Defects in muscarinic receptor-coupled signal transduction in isolated parotid gland cells after in vivo irradiation: evidence for

a non-DNA target of radiation. **British Journal of Cancer**, v. 92, p. 539-546, 2005.

CRUZAT, V. F.; ROGERO, M. M.; BORGES, M. C.; TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 13, n. 5, p. 336-342, 2007.

DAHL, C.; GULDBERG, P. The genome and epigenome of malignant melanoma. **APMIS**, v. 115, p. 1161-1176, 2007.

DARZYNKIEWICZ, Z. *et al.* Features of apoptotic cells measured by Flow Cytometry. **Cytometry**, v. 13, n. 8, p. 795, 1992.

DEBACQ-CHAINIAUX, F.; ERUSALIMSKY, J. D.; CAMPISI, J.; TOUSSAINT, O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*. **Nature protocols**, v. 4, n. 12, p. 1798-1806, 2009.

DEMPSEY, E. C. *et al.* Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 279, p. L429-L438, 2000.

DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES. **Food and drug administration**. <http://www.fda.gov/Drugs/default.htm>, acessado em agosto de 2010.

DIMRI, G. P. What has senescence got to do with cancer? **Cancer Cell**, v. 7, p. 505-512, 2005.

DIMRI, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. **Cell Biology**, v. 92, p. 9363-9367, 1995.

DIMRI, G. P.; ACOSTA K. M.; CAMPISI, J. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14 (ARF) tumor suppressor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 1, p. 273-285, 2000.

DJORDJEVIC, V. B. Free radicals in cell biology. **Int. Rev. Cytol.**, v. 237, p. 57-89, 2004.

DMITRIEVA, N. I.; BURG, M. B. High NaCl Promotes Cellular Senescence. **Cell Cycle**, v. 6, n. 24, p. 3108-3113, 2007.

DOUGHERTY, T. J. *et al.* Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Res.**, v. 38, n. 8, p. 2628-2635, 1978.

DROGE, W. Oxidative stress and aging. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 543, p. 191-200, 2003.

DYSON, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. **Genes & Development**, v. 12, p. 2245-2262, 2010.

ELMORE, L. W. *et al.* E. Adriamycin-induced Senescence in Breast Tumor Cells Involves Functional p53 and Telomere Dysfunction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 35509-35515, 2002.

FAGAGNA, F. A. di. *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. **Nature**, v. 426, p. 194-198, 2003.

FEHÉR, A.; OTVOS, K.; PASTERNAK, T. P.; SZANDTNER, A. P. The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the cell cycle activation (G0-to-G1 transition) of plant cells. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 10, p. 823-826, 2008.

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 15, p. 247-254, 2003.

FOUNDATION SKIN CANCER. **Melanoma**.  
<http://www.skincancer.org/Melanoma/>, acessado em fevereiro de 2010.

FRIEDMANN, P. S.; GILCHREST, B. A. Ultraviolet Radiation Directly Induces Pigment Production by Cultured Human Melanocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 133, p. 88-94, 1987.

FU, Z.; TINDALL, D. J. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. **Oncogene**, v. 27, p. 2312-2319, 2008.

GARTEL, A. L.; RADHAKRISHNAN, S. K. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. **Cancer Res.**, v. 65, p. 3980-3985, 2005.

GOLDSTEN, J. L. *et al.* Receptor-Mediated Endocytosis: Concepts Emerging from the LDL Receptor System. **Rev. Cell Biol.**, v. 1, p. 1-39, 1985.

GOVINDARAJAN, B. *et al.* Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 3, p. 719-729, 2007.

GRAÑA, X.; REDDY, E. P. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). **Oncogene**, v. 11, p. 211-219, 1995.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, p. 851-857, 2007.

GREENBLATT, M. S.; BENNETT, W. P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C. C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res.**, v. 54, p. 4855-4878, 1994.

HA, L. *et al.* ARF functions as a melanoma tumor suppressor by inducing p53-independent senescence. **PNAS**, v. 104, n. 26, 2007.

HADJUR, C.; WAGNIERES, G.; MONNIER, P.; VAN DEN BERGH, H. EPR and Spectrophotometric Studies of Free Radicals ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $^{\bullet}OH$ , BPD- $MA^{\bullet-}$ ) and Singlet Oxygen ( $^1O_2$ ) Generated by Irradiation of Benzoporphyrin Derivative Monoacid Ring A. **Photochem. Photobiol.**, v. 65, n. 818, 1997.

HALLIWELL, B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease, **Encyclopedia of Life Sciences**, Claredon Press: Oxford, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. ed. 5, Claredon Press: Oxford, 1999.

HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. **Nature**, v. 345, p. 458-460, 1990.

HARRISON S.; PAGE C. P.; SPINA D. Airway nerves and protein phosphatase. **General Pharmacology**. v. 32, p. 287-298, 1999.

HASS, N. K.; SMALLEY, K. S.; HERLYN, M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. **J. Mol. Histol.**, v. 35, p. 309-318, 2004.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp. Cell Res.**, v. 25, n. 26, p. 585-621, 1961.

HERRMANN, G. *et al.* Psoralen photoactivation promotes morphological and functional changes in fibroblasts in vitro reminiscent of cellular senescence. **Journal of Cell Science**, v. 111, p. 759-767, 1998.

HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; HARRIS C. C. P53 mutations in human cancers. **Science**, v. 253, n. 49, p. 49-53, 1991.

HUBERMAN, E.; HECKMAN, C.; LANGENBACH, R. Stimulation of Differentiated Functions in Human Melanoma Cells by Tumor-promoting Agents and Dimethyl Sulfoxide. **Cancer Research**, v. 39, p. 2618-2624, 1979.

INSTITUTE OF MOLECULAR & CELLULAR BIOLOGY. **Photodynamic therapy of cancer (PDT).**

[http://www.fbs.leeds.ac.uk/institutes/imcb/IMCB\\_brochure08.pdf](http://www.fbs.leeds.ac.uk/institutes/imcb/IMCB_brochure08.pdf), acessado em abril de 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer de Pele – Melanoma.**

[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=335](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335), acessado em fevereiro de 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Sintomas.**

[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma/sintomas](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/sintomas), acessado em novembro de 2010.

INSITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Pele melanoma.**

[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma), acessado em outubro de 2010.

ISSELBACHER, K. J. *et al.* **Harrison's Principles of Internal Medicine**. USA: McGraw-Hill, v. II, 1994.

JOHNSON, T. M. *et al.* Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 11848-11852, 1996.

JONES, B. A.; RAO, Y. P.; STRAVITZ, T.; GORES, G. J.; Bile salt-induced apoptosis of hepatocytes involves activation of protein kinase C. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. G1109-G1115, 1997.

KADEKARO, A. L. *et al.* Cutaneous Photobiology. The Melanocyte vs. the Sun: Who, Will, Win the Final Round? **Pigment Cell Res.**, v. 16, p. 434-447, 2003.

KANEKO, T. S.; IKEDA, K.; NAKANISHI, M. Phorbol ester inhibits DNA damage-induced apoptosis in U937 cells through activation of protein kinase C. **Life Sciences**, v. 65, n. 21, p. 2251-2258, 1999.

KANNAN, K. *et al.* Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in a murine melanoma model. **PNAS**, v. 100, n. 3, p. 1221-1225, 2003.

KIERSZEMBAUM, A. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Tradução de RANGEL, N.V.; AZEVEDO, R.A. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 11, p. 324-325, 2004.

KIM, W. Y.; SHARPLESS, N. E. The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. **Cell**, v. 127, p. 265-275, 2006.

KIYONO, T. *et al.* Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. **Nature**, v. 396, p. 84-88, 1998.

KOCHEVAR, I. E.; REDMOND, R. W. Photosensitized production of singlet oxygen. **Methods Enzymol.**, v. 319, p. 20-28, 2000.

KOH, J.; ENDERS, G. H.; DYNLACHT, B. D.; HARLOW, E. Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. **Nature**, v. 375, p. 506-510, 1995.

KOLAROVA, H. *et al.* In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. **Toxicology in vitro**, v. 21, p. 249-253, 2007.

KULANTHAIVEL, P. *et al.* Balanol: a novel and potent inhibitor of protein kinase C from the fungus *Verticillium balanoides*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 115, p.6452-6453, 1993.

KURZ, D. J.; DECARY, S.; HONG, Y.; ERUSALIMSKY, J. D. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. **J. Cell Sci.**, v. 113, p. 3613-3622, 2000.

LEBEDEVA, I. V. *et al.* Strategy for reversing resistance to a single anticancer agent in human prostate and pancreatic carcinomas. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 104, n. 9, p. 3484-3489, 2007

LEVY, J. G. Photodynamic therapy. **Trends Biotechnol.**, v. 13, n. 1, p. 14-8, 1995.

LIN, A. W. *et al.* Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. **Genes & Development**, v. 12, p. 3008-3019, 1998.

LIU, S.; YAMAUCHI, H. p27-Associated G1 arrest induced by hinokitiol in human malignant melanoma cells is mediated via down-regulation of pRb, Skp2 ubiquitin ligase, and impairment of Cdk2 function. **Cancer Letters**, v. 286, p. 240-249, 2009.

MA, J. *et al.* Effects of apigenin on cell proliferation of human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3 in vitro. **J. of N. Med. University**, v. 21, p. 94-98, 2007.

MACIP, S. *et al.* Influence of Induced Reactive Oxygen Species in p53-Mediated Cell Fate Decisions. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 23, p. 8576-8585, 2003.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

MAGALDI, A. J. B. Revisão/Atualização em Fisiologia e Fisiopatologia Renal: Regulação hormonal da reabsorção de água no ducto colector. **J. Bras. Nefrol.**, v. 18, n.4, p. 401-404, 1996.

MAGALHÃES, J. P.; CHURCH, G. L. H. M. Cells discover fire: Employing reactive oxygen species in development and consequences for aging. **Experimental Gerontology**, v. 41, p. 1-10, 2006.

MAIER, B. *et al.* Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. **Genes & Development**, v. 18, p. 306-319, 2004.

MARCHESI, M. S. P. **Aspectos químicos e fotoquímicos de liberação controlada de óxido nítrico a partir de complexos nitrosilos de rutênio: ensaios farmacológicos e de citotoxicidade.** 169f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de oxigênio singlete em sistemas. **Quím. Nova**, v. 23, n. 5, p. 686-689, 2000.

MEDRANO, E. E. *et al.* Terminal differentiation and senescence in the human melanocyte: repression of tyrosine-phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase 2 selectively defines the two phenotypes. **Mol. Biol. Cell**, v. 5, n. 4, p. 497-509, 1994.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 355, p. 51-65, 2006.

MOOI, W. J.; PEEPER, D. S. Mechanisms of Disease: Oncogene-Induced Cell Senescence - Halting on the Road to Cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 355, p. 1037-1046, 2006.

MOORE, K. L. **Embriologia básica.** Colaboração de TORCHIA, M. G. Tradução de COSTA, A. M. M. *et al.* Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 18, p.300, 2008.

MULLER, F. L. *et al.* Trends in oxidative aging theories. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 43, n. 4, p. 477-503, 2007.



NELSON, A. A.; TSAO, H. Melanoma and genetics. **Clinics in Dermatology**, v. 27, p. 46-52, 2009.

NISHIZUKA, Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. **FASEB J.**, v. 9, p. 484-496, 1995.

NSEYO, U. O. Photodynamic therapy. **Urol. Clin. North Am.**, v. 19, n. 3, p. 591-599, 1992.

OLBRICH, H. G. *et al.* Protective action of hydroxyethyl rutosides on singlet oxygen challenged cardiomyocytes. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, p. 671-676, 1996.

OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 1, p. 1-21, 2002.

OLIVA, J. L.; CAINO, M. C.; SENDEROWICZ, A. M.; KAZANIETZ, M. G. S-Phase-specific Activation of PKC $\alpha$  Induces Senescence in Non-small Cell Lung Cancer Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 9, p. 5466-5476, 2008.

OLIVEIRA, I. O.; JUNIOR, H. L. A. Conhecimentos atuais sobre a biologia dos melanócitos no folículo piloso humano. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 3, p. 331-343, 2003.

ORLOW, S. J. *et al.* High-molecular-weight forms of tyrosinase and the tyrosinase-related proteins: evidence for a melanogenic complex. **J. Invest. Dermatol.**, v. 103, p. 196-201, 1994.

PASSOS, J. F. *et al.* Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. **Molecular Systems Biology**, v. 6, n. 347, 2010.

PAULINO, T. P. *et al.* Use of Visible Light-based Photodynamic Therapy to Bacterial Photoinactivation. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 33, n. 1, p. 46-49, 2005.

PAULOVICH, A. G.; TOCZYSKI, D. P.; HARTWELL, L. H. When checkpoints fail. **Cell**, v. 88, p. 315-321, 1997.

PAVLAKOVIC, G. *et al.* Activation of protein kinase C by trimethyltin: relevance to neurotoxicity. **J. Neurochem.**, v. 65, p. 2338-2343, 1995.

PERCIVAL, M. P.; DODGE, A. D. Photodynamic Effects of Rose Bengal on Senescent Flax Cotyledons. **Journal of Experimental Botany**, v. 34, n. 138, p. 47-54, 1983.

PERIS, K. *et al.* UV Fingerprint *CDKN2a* but No p14ARF Mutations in Sporadic Melanomas. **J. Invest. Dermatol.**, v. 112, p. 825-826, 1999.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Quím. Nova**, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007.

PFALLET, R.; SMYTHE, C.; NEWPORT, J. W. Assembly/disassembly of the nuclear envelope membrane: Cell cycle-dependent binding of nuclear membrane vesicles to chromatin in vitro. **Cell**, v. 65, n. 2, p. 209-217, 1991.

PHILLIPS, H. J. **Dye exclusions tests for cell viability. In: Tissue Culture, methods and applications**, Kruse, J. R.: Patterson, J. R. M. K. (eds). A. P.: New York, p. 406-408, 1973.

PIEPKORN, M. The expression of p16INK4a, the product of a tumor suppressor gene for melanoma, is upregulated in human melanocytes by UVB irradiation. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 42, p. 741-745, 2000.

POELE, R. H. *et al.* DNA damage is able to induce senescence in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Research**, v. 62, p. 1876-1883, 2002.

RAHMANTO, A. S.; MORGAN, P. E.; HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Cellular effects of photogenerated oxidants and long-lived, reactive, hydroperoxide photoproducts. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1505-1515, 2010.

RAI, P. *et al.* Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 106, p. 169-174, 2008.

RAMSEY, M. R.; SHARPLESS, N. E. ROS as tumour suppressor? **Nat. Cell Biol.**, v. 8, p. 1213-1215, 2006.

RAY, A. *et al.* P27Kip1 inhibits cyclin D-cyclin-dependent kinase 4 by two independent modes. **Mol. Cell. Biol.**, v. 29, p. 986-999, 2009.

REDMOND, R. W.; GAMLIN, J. N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. **Photochem. Photobiol.**, v. 70, p.391-475, 1999.

REINERS, J. J.; KLEINMAN, M.; JOIAKIM, A.; MATHIEU, P. A. The Chemotherapeutic Agents XK469 (2-{4-[(7-Chloro-2-quinoxalinyloxy]phenoxy}propionic acid) and SH80 (2-{4-[(7-Bromo-2-quinolinyloxy]phenoxy}propionic acid) Inhibit Cytokinesis and Promote Polyploidy and Induce Senescence. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 328, n. 3, p. 796-806, 2009.

RICHTER, A. M. *et al.* Activation of benzoporphyrin derivative in the circulation of mice without skin photosensitivity. **Photochem. Photobiol.**, v. 59, n. 3, p. 350-355, 1994.

RIZOS, H. *et al.* A melanoma-associated germline mutation in exon 1 $\beta$  inactivates p14ARF. **Oncogene**, v. 20, p. 5543-5547, 2001.

ROBERSON, R. S. *et al.* Escape from Therapy-Induced Accelerated Cellular Senescence in p53-Null Lung Cancer Cells and in Human Lung Cancers. **Cancer Res.**, v. 65, n. 7, p. 2795-2803, 2005.

SANTOS, A. A.; MEDINA, S. V.; SHOLL-FRANCO, A.; ARAUJO, E. G. PMA decreases the proliferation of retinal cells in vitro: the involvement of acetylcholine and BDNF. **Neurochemistry International**, v. 42, p. 73-80, 2003.

SANTOS, V. A. dos. **O efeito da melanina em células tratadas com oxigênio molecular singlete**. 96f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SAUER, H.; WARTENBERG, M.; HESCHELER, J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 11, p. 173-186, 2001.

SERRANO, M.; HANNON G. J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, v. 366, p. 704-707, 1993.

SERRANO, M. *et al.* Role of the INK4a Locus in Tumor Suppression and Cell Mortality. **Cell**, v. 85, p. 27-37, 1996.

SERRANO, M. *et al.* Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. **Cell**, v. 88, p. 593-602, 1997.

SETLOW, R. B.; GRIST, E.; THOMPSON, K.; WOODHEAD, A. D. Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 6666-6670, 1993.

SHARPLESS, N. E. *et al.* Loss Of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. **Nature**, v. 413, p. 86-91, 2001.

SHARPLESS, N. E.; DEPINHO, R. A. The INK4A/ARF locus and its two gene products. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 9, p. 22-30, 1999.

SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Telomeres and Telomerase: Implications for Cancer and Aging. **Radiation Research Society**, v. 155, p. 188-193, 2001.

SHERR, C.J. Cancer Cell Cycles. **Science**, v. 274, p. 1672-1677, 1996.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev.**, v. 13, p. 1501-1512, 1999.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.

SLOMINSKI, A.; TOBIN D. J.; SHIBAHARA. S; WORTSMAN, J. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. **Physiological Reviews**. v. 84, p.1155-1228, 2004.

SMETANA, Z. *et al.* Photodynamic inactivation of herpes viruses with phthalocyanine derivatives. **Photochem. Photobiol.**, v. 22, n. 1, p. 37-43, 1994.

SMIT, N. P.M. *et al.* Increased Melanogenesis is a Risk Factor for Oxidative DNA Damag-Study on Cultured Melanocytes and Atypical Nevus Cells. *Photochemistry and Photobiology*, 84: 550-555, 2008.

SONNTAG, C. V. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair. DNA and Double-Stranded Oligonucleotides. **A Chemical Perspective Springer Berlin Heidelberg**, cap. 12, 2006.

STEIN, G. H.; DRULLINGER, L. F.; SOULARD, A.; DULIC, V. Differential Roles for Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21 and p16 in the Mechanisms of Senescence and Differentiation in Human Fibroblasts. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 3, p. 2109-2117, 1999.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D. Pyrrolic photosensitizers. **Curr. Med. Chem.**, v. 3, p. 239, 1996.

STRECKER, V. *et al.* Aging of different avian cultured cells: lack of ROS-induced damage and quality control mechanisms. **Mech. Ageing Dev.**, v. 131, n. 1, p. 48-59, 2010.

STROBER, W. **Trypan Blue exclusion test of cell viability**. In: Coligan JE, editor. *Current protocols in immunology*, New York: Wiley & Sons, 2001.

TAKAHASHI, A. *et al.* Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. **Nat. Cell. Biol.**, v. 8, p. 1291-1297, 2006.

TAKAHASHI, Y.; OGRA, Y.; SUZUKI, K. T. Synchronized generation of reactive oxygen species with the cell cycle. **Life Sciences**, v. 75, p. 301-311, 2004.

TALIOR, I.; TENNENBAUM, T.; KUROKI, T.; Eldar-Finkelman, H. PKC- $\delta$ -dependent activation of oxidative stress in adipocytes of obese and insulin-resistant mice: role for NADPH oxidase. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 288, p. E405-E411, 2005.

TAPPENIER, H.; JESIONEK, A. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. **Muench. Med. Wochschr.**, v. 1, p. 2042-2044, 1903.

TEGOS, G. P. *et al.* Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps Potentiate Antimicrobial Photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n.9, p. 3202-3209, 2008.

TEPPERMAN, B. L.; SOPER, B. D. CHANG, Q. Effect of protein kinase C activation on intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling and integrity of intestinal epithelial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 518, p. 1-9, 2005.

TIAN, S. Z. *et al.* Comparison of morphology, viability, and function between blood and milk neutrophils from peak lactating goats. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, p. 39-45, 2005.

TOUSSAINT, O.; MEDRANO, E. E.; ZGLINICKI, T. V. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. **Experimental Gerontology**, v. 35, p. 927-945, 2000.

VAFA, O. *et al.* c-Myc Can Induce DNA Damage, Increase Reactive Oxygen Species, and Mitigate p53 Function: A Mechanism for Oncogene-Induced Genetic Instability. **Molecular Cell**, v. 9, p. 1031-1044, 2002.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VALKO, M. C. J. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VENKATACHALAM, P. *et al.* Regulation of normal cell cycle progression by flavin-containing oxidases. **Oncogene**, v. 27, p. 20-31, 2008.

VIJAYAN, K.; SZOTEK, E. L.; MARTIN, J. L.; SAMAREL, A. M. Protein kinase C- $\alpha$ -induced hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 287, p. H2777-H2789, 2004.

WALKER, G. J. *et al.* Virtually 100% of Melanoma Cell Lines Harbor Alterations at the DNA Level Within *CDKN2A*, *CDKN2B*, or One of Their Downstream Targets. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 22, p. 157-163, 1998.

WANG, C. *et al.* DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. **Aging Cell**, v. 8, p. 311-323, 2009.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 4, 2002.

WEI, S.; WEI, W.; SEDIVY, J. M. Expression of Catalytically Active Telomerase Does Not Prevent Premature Senescence Caused by Overexpression of Oncogenic Ha-Ras in Normal Human Fibroblasts. **Cancer Research**, ed. 59, p. 1539-1543, 1999.

WEISHAUPT, K. R.; GOMER, C. J.; DOUGHERTY, T. J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. **Cancer Research**, v. 36, p. 2326-9, 1976.

WHEATON, K.; RIABOWOL, K. Protein Kinase C $\delta$  Blocks Immediate-Early Gene Expression in Senescent Cells by Inactivating Serum Response Factor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 16, p. 7298-7311, 2004.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, p. 278-286, 2008.

WOODBURN, K. W. *et al.* Photodynamic Therapy of B16-F10 Murine Melanoma with Lutetium Texaphyrin. **Society for Investigative Dermatology**, v. 110, n. 5, p. 746-751, 1998.

WOODMAN, P. G.; MUNDY, D. I.; COHEN, P.; WARREN, G. Cell-free fusion of endocytic vesicles is regulated by phosphorylation. **J. Cell Biol.**, v. 116, n. 2, p. 331-338, 1992.

XIE, D. X. *et al.* Analysis of Cell Cycle Checkpoints by Cyclins/DNA Flow Cytometry. **Chinese Journal of Cancer**, v. 24, n. 9, p. 1151-1155, 2005.

YE, X. *et al.* The Mechanism of Epipodophyllotoxin-induced Thymocyte Apoptosis: Possible Role of a Novel  $\text{Ca}^{2+}$ -independent Protein Kinase. **Cellular Immunology**, v. 151, p. 320-335, 1993.

ZGLINICKI, T. V. Oxidative stress shortens telomeres. **Trends Biochem. Sci.**, v. 27, p. 339-344, 2002.

ZHANG, X. M.; CHEN, J.; XIA, Y. G.; XU, Q. Apoptosis of murine melanoma B16-BL6 cells induced by quercetin targeting mitochondria, inhibiting expression of PKC- $\alpha$  and translocating PKC- $\delta$ . **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 55, p. 251-262, 2005.